

Optimierung und Evaluierung eines klinischen Samplingsystems basierend auf der Offenen Mikroperfusion

Diplomarbeit

von

Christoph Troschl



Institut für Medizintechnik
Technische Universität Graz
Kronesgasse 5 / II, A – 8010 Graz
Vorstand: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Rudolf Stollberger

Begutachter:

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

In Zusammenarbeit mit der JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH
HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften



Betreuer:

Dipl.-Ing. Manfred Bodenlenz
Dipl.-Ing. Christian Höfferer

Graz, im Mai 2011

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des JOANNEUM RESEARCH HEALTH – Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften für das angenehme Arbeitsklima und die Kollegialität während meiner Zeit als Diplomand. Mein spezieller Dank gilt den Mitarbeitern des Labors für die Durchführung sämtlicher Analytik. Bei Mag. Andrea Wutte von Seiten des Zentrums für medizinische Forschung für die Reservierung der Untersuchungsäumlichkeiten des clinical research centers und zeitliche Einteilung der Probandenbesuche. Auch möchte ich meinen Betreuern, Dipl.-Ing. Manfred Bodenlenz und Dipl.-Ing. Christian Höfferer sowie Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. Frank Sinner und seiner Gruppe „Biomedizinische Technik und Monitoring“ am JOANNEUM RESEARCH HEALTH für die konsequente und kompetente Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn Hermann Scharfetter für die Betreuung meiner Diplomarbeit von Seiten der TU Graz.

Ich möchte hier die Möglichkeit ergreifen und meinen Freunden in Klagenfurt, Graz und auch außerhalb Österreichs danken, die mich während meiner Studienzeit begleitet und für Ablenkung vom „Studienstress“ gesorgt haben. Im speziellen Corinne und ihrer Familie, die mir in der Endphase meiner Diplomarbeit die nötige Unterstützung und Vertrauen geschenkt haben: Van harte bedankt!

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und Großeltern ohne deren persönliche Hilfe und finanzielle Mittel ich dieses Studium nicht vollenden hätte können.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....

date

.....

(signature)

Kurzfassung

Für die klinische Untersuchung der Pharmakokinetik und -dynamik von dermatologischen Wirkstoffen wird eine kontinuierliche Samplingmethode für die Haut benötigt. Die neue Methode der dermalen Offenen Mikroperfusion (OFM) ermöglicht den direkten Zugang zur dermalen Zwischenzellflüssigkeit der Haut und ist potentiell auch für lipophile topische Wirkstoffe geeignet. In dieser Arbeit sollte ein bestehendes Samplingsystem für das *in vivo* Sampling eines lipophilen topischen Wirkstoffes evaluiert und optimiert werden.

Die OFM-Samplingmaterialien wurden zunächst *in vitro* auf ihre Adsorptionseigenschaften untersucht, und ein modifiziertes Push-System *in vivo* auf Samplingstabilität über 24 Stunden erprobt. Als Konsequenz wurde ein völlig neues tragbares Push-Pull Samplingsystem mit einer speziellen Probensammeleinheit für adsorptionsfreies Sampling entwickelt. Dieses System wurde in einer klinischen Proof-of-Concept Studie an 12 Psoriasis-Patienten erprobt. Am Tag 1 und Tag 8 einer topischen Therapie mit einem lipophilen Entzündungshemmer wurden 6 OFM-Katheter in die behandelte Haut gelegt (3 in läsionale, 3 in nicht läsionale Haut) und dermale Proben im Stundenintervall über 25 Stunden gesammelt. Die Proben wurden auf Volumen und im Labor auf die Konzentration des Wirkstoffes und eines großmolekularen Entzündungsparameters untersucht. Die Volumenmessungen zeigen stabile Samplingvolumina über 25 Stunden ohne Volumenverlust im Gewebe. Die unterschiedlichen Wirkstoffprofile am Tag 1 und Tag 8 weisen auf eine Anreicherung in der Haut hin (‚Kinetik‘) und die verringerte Konzentration des Entzündungsparameters am Tag 8 auf eine erzielte lokale Wirkung (‚Dynamik‘).

Die Proof-of-Concept Studie konnte die Eignung der dermalen OFM und des tragbaren Multi-Samplingsystems zum Sammeln lipophiler und großmolekularer Substanzen zeigen. Die Methode ist daher für diese herausfordernden Studien eine Alternative zur Methode der dermalen Mikrodialyse. Das System soll nach den internationalen Normen für die Medizinprodukteherstellung zu einem zertifizierten Medizinprodukt für die medizinische Grundlagen- und Arzneimittelforschung weiterentwickelt werden.

Schlüsselwörter: Offene Mikroperfusion, intradermal, Zwischenzellflüssigkeit, Zytokine, lipophil, topische Wirkstoffe

Abstract

Clinical research on pharmacokinetics and -dynamics of dermatological agents requires a continuous sampling method in skin. A new method, dermal open-flow microperfusion (ofm) enables direct access to interstitial fluid and is potentially adequate for lipophilic topical agents. This thesis aims to evaluate and optimise an existing sampling system for *in vivo* sampling of a lipophilic agent.

Initially the ofm-sampling materials had been tested *in vitro* for their adsorption properties. Then a modified push-system was tested 24 hours *in vivo* for its sampling stability. As a consequence a brand new portable push-pull sampling system with a special sampling unit was developed for adsorption-free sampling. This system was evaluated in a clinical proof-of-concept trial on twelve patients suffering from psoriasis. On day 1 and day 8 of a topical therapy with an anti-inflammatory agent 6 ofm probes were implanted (3 in lesional, 3 in non-lesional skin) and interstitial fluid was sampled in 60min fractions for 25 hours. The sample volume was determined and the sample analysed for the concentration of the agent and a high molecular weight pro-inflammatory cytokine. The results showed stable sample volumes for 25 hours without volume losses to dermal tissue. Different agent profiles on day 1 and day 8 indicated accumulation of the agent in skin ("kinetics") and a decreased concentration of the pro-inflammatory cytokine on day 8 indicated a locally attained effect ("dynamics").

The proof-of-concept trial showed that dermal OFM and the portable multisampling system are able to sample lipophilic and high molecular weight substances. In demanding studies this method is a good alternative to dermal microdialysis. This system shall be further developed to a certified medical device for clinical research and pharmacological studies.

Keywords: open-flow microperfusion, intradermal, interstitial fluid, cytokine, lipophilic, topical agents

Begriffserklärungen.....	1
Abkürzungen.....	2
1 Einleitung	3
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Anpassungen am dermalen Samplingsystem.....	17
2.1.1 In vitro Adsorptionstest.....	18
2.1.2 In vivo Flussratentest	21
2.1.3 In vivo Vorversuch mit Proben-Sammel-System und Minipumpe	25
2.2 Das dermale Samplingsystem	28
2.2.1 Dermaler Mikroperfusionskatheter.....	29
2.2.2 Fluidisches System	32
2.2.3 Proben-Sammel-System	35
2.3 Klinische Studie.....	37
2.3.1 Studienteilnehmer.....	38
2.3.2 Studienprotokoll	39
2.3.3 Probenanalyse & Datenauswertung.....	43
3 Ergebnisse	47
3.1 Anpassungen am dermalen Samplingsystem.....	47
3.1.1 In vitro Adsorptionstests	47
3.1.2 In vivo Flussratentest	50
3.1.3 In vivo Vorversuch mit neuer Minipumpe	53
3.2 Das dermale Samplingsystem	55
3.3 Klinische Studie.....	58
3.3.1 Gesammelte Volumina und erzielte Flussraten	58
3.3.2 Setztiefen	60
3.3.3 Wirkstoffkonzentration	61
3.3.4 TNF alpha.....	64
3.3.5 Biopsie.....	65
4 Diskussion	66
4.1 Das dermale Samplingsystem	66
4.2 Ergebnisse der klinischen Studie	68
4.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....	70
Literatur	71

Begriffserklärungen

„dermal“	die Haut/Dermis betreffend
„Finn-chambers“	Metallschälchen zur Dosierung von Cremes
„in vivo“	im lebenden Organismus
„läsional“	bezieht sich in dieser Arbeit auf: mit psoriatischen Hautschuppen befallene Haut
„nicht läsional“	Nicht von Schuppenflechte befallene Haut eines Psoriasispatienten
„Patienten“	Es beinhaltet jeden Patienten und jede Patientin
„Perfusat“	Eine physiologische Flüssigkeit, die durch die Mikroperfusionskatheter gepumpt wird.
„Pharmakodynamik“	beschreibt die Wirkung eines Wirkstoffes im Körper
„Pharmakokinetik“	beschreibt die Art & Weise und Geschwindigkeit der Aufnahme eines Wirkstoffes in den Körper
„Probanden“	Es beinhaltet jeden Probanden und jede Probandin
„Probenbehälter“	PCR Tubes oder Soft Tubes®. Probenbehältnis mit einem Inhalt von 200 µl und Verschlussdeckel.
„Probenflüssigkeit“	Erhaltene Flüssigkeit aus den Mikroperfusionskathetern. Besteht aus Perfusat und dermaler Zwischenzellflüssigkeit.
„pull“	aktiver Probenflüssigkeits-Transport vom Katheter in die Glaskapillare.
„push“	aktiver Perfusat-Transport in den Katheter.
„samplen“	Kontinuierliches Sammeln von Probenflüssigkeit (Rückperfusat) in auswechselbaren Einweg-Glaskapillaren
„Sample“	Gesammelte Flüssigkeit einer Probe, die in einem Probenbehälter zur Analyse ins Labor geschickt wird.
„Steripacks“	Luftdichtverschließbares Sterilisationsverpackungsmaterial
„Wirkstoff“	medizinische Substanz, die in dieser Arbeit zu sammeln und nachzuweisen ist.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
CRC	Clinical Research Center (Studienräume am ZMF)
Da	Dalton, Einheit für Molekülgröße
EKG	Elektrokardiogramm
ELO-MEL	Isotonische Infusionslösung (Hauptbestandteil des Perfusats)
FDA	US Food and Drug Administration
HEALTH	JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften
ID	Innendurchmesser
ISF	Zwischenzellflüssigkeit (Interstitialflüssigkeit)
LLOQ	Lower limit of quantification (Untere Bestimmungsgrenze)
MUG	Medizinische Universität Graz
OFM	Offene Mikroperfusion (open-flow microperfusion)
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon®)
PVC	Polyvinylchlorid (Tygon®)
SD	Standardabweichung
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor- α , ein Entzündungsfaktor (Zytokin)
Tygon	Tygon® S-54-HL Medical Tubing (Pumpschlauchmaterial)
ZMF	Zentrum für medizinische Grundlagenforschung Graz

1 Einleitung

Seit Ende der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts nahm die Neuzulassung von Medikamenten und Wirksubstanzen stetig ab. Im Jahr 2007 wurde ein 25-jähriger Tiefstand erreicht [1], [2]. Bereits im Jahr 2003 startete die amerikanische „food and drug administration“ (FDA), die weltweit größte Zulassungsbehörde, eine Initiative, um diesem Trend gegenzusteuern. Die sogenannte „critical path initiative“ hat zum Ziel den Weg zu einem zugelassenen Arzneimittel effizienter zu gestalten. Die Zielsetzung ist, die in den letzten Jahren explodierenden Kosten zwischen der Entdeckung oder Entwicklung einer biologisch wirksamen Substanz und der Arzneimittelzulassung zu verringern (siehe Abb. 1), damit wieder mehr Arzneimittel erfolgreich und schneller den Markt erreichen können.

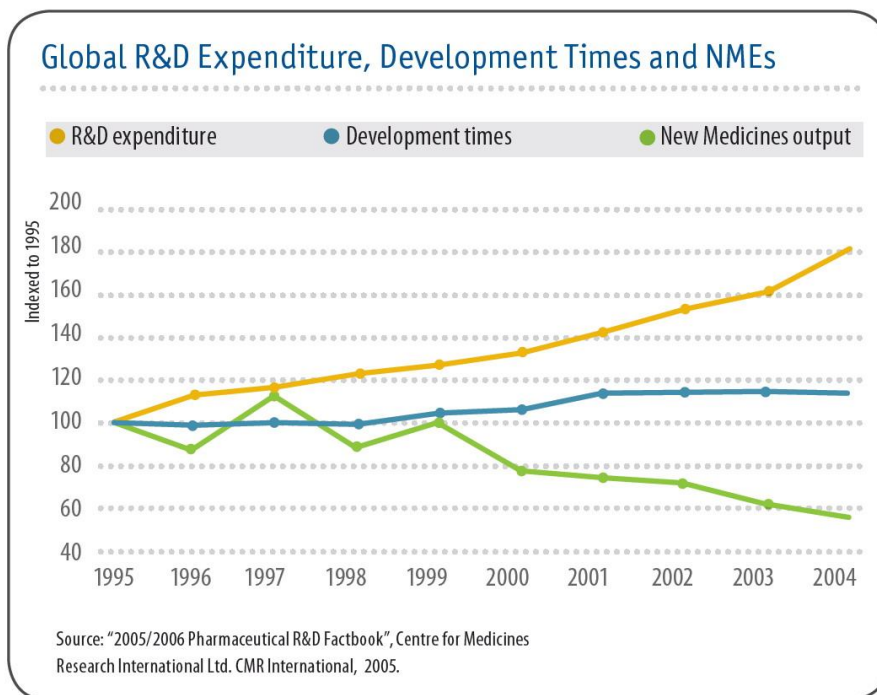


Abb. 1 Anstieg der Kosten für Entwicklung und Forschung bei sinkender Anzahl neuer medizinischer Substanzen

Im Bericht der Initiative [3] stellte die FDA fest, dass die Kostenexplosion durch späte oder falsche „Go/No-Go“-Entscheidungen in den einzelnen Projektphasen zustande kam, im speziellen, weil bei einem komplexen Entwicklungsprojekt, das ein Arzneimittelentwicklungsprojekt darstellt, immer drei Dimensionen zu berücksichtigen sind: 1) Sicherheit des Produktes in allen

Projektphasen, 2) medizinischer Nutzen des Produktes und 3) Produzierbarkeit des Produktes. Dafür will die FDA gemeinsam mit den Produktentwicklern der großen Pharmafirmen und Forschern geeignete Hilfswerkzeuge bereitstellen, die eine „state-of-the-art“ Entwicklung und Produktion erleichtern. Für die Arzneimittelzulassung verlangt die FDA einen Nachweis über eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe. Die Frage nach dem medizinischen Nutzen kann nicht immer leicht und wenn dann nur unter sehr hohen Kosten beantwortet werden, weil in vitro- und Tierversuche immer seltener und dann mit größeren Auflagen zugelassen werden. Weiters verlangt die FDA inzwischen einen Nachweis über die notwendige Wirkstoffkonzentration des Medikamentes, um Nebenwirkungen und Folgeschäden auf Grund von zu hoher Dosierung zu vermeiden. Kann dieser, mangels geeigneter Analyse oder Messtechnik, nicht erbracht werden, führt dies unweigerlich zur Projekteinstellung bzw. auch behördlichen Verweigerung der Zulassung eines vielleicht aussichtsreichen Kandidaten. Gerade bei Wirkstoffen, die für einen Aufnahmeweg durch die Haut entwickelt wurden, fehlt es an geeigneten und standardisierten Messmethoden. Dabei wäre der transdermale Aufnahmeweg von Medikamenten zu favorisieren, da er den für viele Substanzen hinderlichen Weg durch den Magen-Darm-Trakt umgeht. In den letzten Jahren kamen vermehrt Transdermal-Therapeutische-Systeme auf den Markt, die eine wesentlich geringere Wirkstoffkonzentration benötigen als oral eingenommene, deren Konzentration großteils in der Leber abgebaut wird (First-Pass-Effekt). Die in der Vergangenheit übliche orale Medikamenteneinnahme erwies sich dadurch immer ungeeigneter [4], [13]. Um unerwünschte Nebenwirkungen und Folgeschäden weitest gehend auszuschließen, soll der Wirkstoff so direkt wie möglich ins betroffene Gebiet gebracht werden. Durch die lokale Applikation wird eine Verkürzung des Transportweges erreicht und weiters kann die Dosis auf die für die Heilung notwendige Konzentration verringert werden. Aus Mangel an genauen Vorhersagemöglichkeiten oder quantitativen Messmethoden konnten wichtige Entscheidungen bei der Medikamentenentwicklung erst viel zu spät getroffen werden, was einen wesentlichen Anteil an der Kostenexplosion ausmacht. „The appearance of new quantitative measuring technologies absolutely galvanizes new drug research“, aus [3] S.23

Die menschliche Haut [4], [13]

Die Haut gliedert sich in drei Schichten:

- die Oberhaut (Epidermis) bestehend aus Hornschicht & Keimschicht
- die Lederhaut (Dermis) mit ersten kleineren Blutgefäßen
- die Unterhaut (Hypodermis) mit größeren Blutgefäßen und Fettgewebe

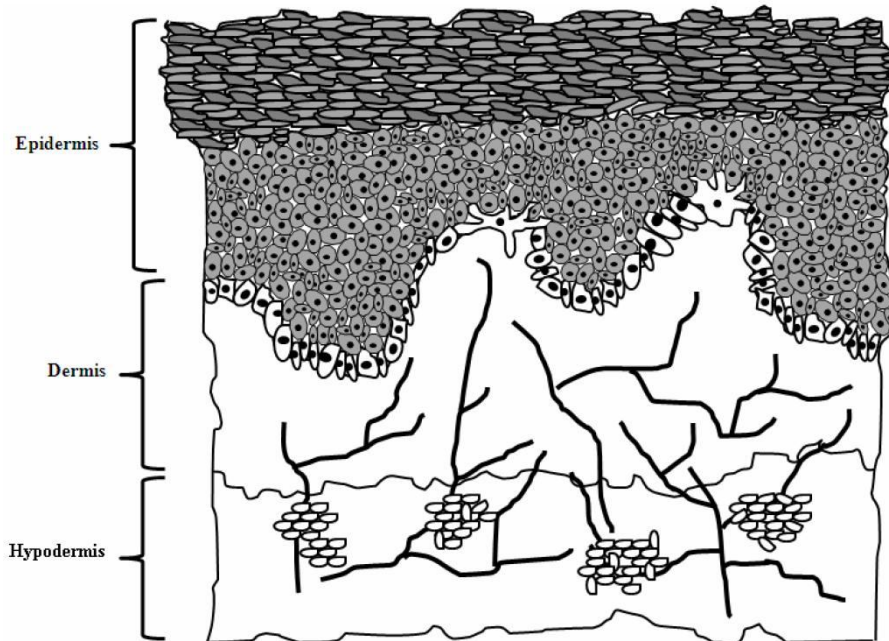


Abb. 2 Der Aufbau der menschlichen Haut [5]

Die menschliche Haut ist ein mehrschichtiges und komplexes Gebilde. Es können folgende Schutzfunktionen zusammengefasst werden:

- Schutz vor Hitze, Kälte und Strahlung
- Schutz gegenüber Stößen, Druck und Reibung
- Schutz vor chemischer Schädigung
- Schutz gegen Eindringen von Mikroorganismen
- Schutz vor Verlust von Wasser und Wärme

„Für die Barrierefunktion ist hauptsächlich die äußerste Schicht der Epidermis, das so genannte *Stratum corneum*, zuständig. Das *Stratum corneum* oder Hornschicht ist ein 10 bis 50µm dickes Gewebe und besteht aus verhornten Zellen die ~30 µm breit und ~1 µm hoch sind. Diese Hornzellen sind

abgestorbene Zellen und hauptsächlich mit teilkristallinen Keratinfilamenten gefüllt. Die Zellen werden von einer amorphen Matrix umgeben, die aus einer Lipid- Wasser- Doppelschicht und nichtfasrigen Proteinen besteht. Die Fette zwischen den Zellen bilden mit den Hornzellen gemeinsam eine wasserabweisende Schutzschicht. Die Lipidfraktion besteht wiederum aus freien Fettsäuren und Ceramiden. Man kann diesen Aufbau mit einer Ziegelmauer vergleichen, bei der die Hornzellen (Ziegel) durch die interzelluläre Masse (Mörtel) verbunden werden (im Englischen daher auch "brick and mortar model" genannt). Dieses Gefüge wird nur durch Haarfollikel und Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen unterbrochen, wobei diese aber nur einen Flächenanteil von 0,1 bis 0,5 % ausmachen.", aus [13]

Lipophilität

„Als lipophil werden Stoffe bezeichnet, die sich in Fetten oder Ölen leicht lösen lassen, oder ihrerseits Fette und Öle gut lösen können.“, aus [13]

Der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (KOW, p_{ow} bzw. $\log P$) gibt das Verhältnis der Konzentrationen einer gelösten Substanz in einem Zweiphasensystem aus 1-Oktanol und Wasser an.

$$p_{ow} = \frac{C_{n-Octanol}}{C_{H_2O}}$$

p_{ow} : Verteilungskoeffizient

$C_{n-Octanol}$: Konzentration des Stoffes gelöst in n-Oktanol

C_{H_2O} : Konzentration des Stoffes gelöst in Wasser

p_{ow} ist ein dimensionsloser Verteilungskoeffizient und wird gewöhnlich in Form eines Zehnerlogarithmus ($\log P$) angegeben. Je höher sein Wert, desto lipophiler ist ein Stoff.

Der in der klinischen Studie (siehe 2.3) nachzuweisende Wirkstoff hat einen $\log P$ von ~ 3 . Als Vergleich: Pimecrolimus und Tacrolimus zählen in der Literatur zu den „hochlipophilen Substanzen“ (engl. „high lipophilic“). Ihr $\log P$ Wert liegt bei 6-7.

Die Schuppenflechte (Psoriasis) [6]

Die Schuppenflechte ist eine hartnäckige entzündliche Hauterkrankung, bei der sich vor allem auf Kopfhaut, Ellbogen, Knien und im unteren Rückenbereich rote Hautverdickungen bilden, die mit silbrigen Schuppen überzogen sind. Sie kann neben der Haut auch Gelenke und Zehen/Fingernägel befallen. Da es sich um eine chronische Entzündung handelt, sind bei einer medikamentösen Therapie Mittel mit entzündungshemmender Tendenz von Vorteil. Es werden daher Wirkstoffe entwickelt, welche die entzündliche Reaktion in der Haut bekämpfen können, indem sie z.B. die weitere Freisetzung von pro-inflammatorischen Substanzen in der Haut (sog. Zytokinen) blockieren.

Die Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche, wiederkehrende Erkrankung. Sie ist eine Immunkrankheit mit genetischer Veranlagung. Heute wird die Psoriasis als T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung mit bislang unbekanntem auslösendem Antigen (ein Antigen löst eine Immunreaktion aus) verstanden. Sie beginnt häufig im frühen Erwachsenenalter und begleitet die Betroffenen nach dem erstmaligen Auftreten meist ein Leben lang.

Das klinische Bild der Psoriasis kann in vier Gruppen unterteilt werden, wobei Psoriasis vulgaris wiederum vier Untergruppen zeigt:

1. Psoriasis vulgaris
 - a. Plaque- Typ Psoriasis
 - b. Psoriasis guttata
 - c. Psoriasis inversa
 - d. Erythrodermie
2. Psoriasis capitis
3. Nagelpsoriasis
4. Pustulöse Psoriasisformen

Die häufigste Form ist die Psoriasis vulgaris vom Plaque-Typ mit klassischem Befall der Ellenbogen, Knie und Steißregion bzw. auch Kopf, Gehörgänge, Bauchnabel, Pofalte sowie Hand- und Fußflächen. In dieser Studie kamen nur Patienten des Typs 1a (Psoriasis vulgaris Plaque Typ) als Probanden in Frage. Ihre Plaques befanden sich im Ellebogen oder Kniebereich.

Methoden zum Sammeln von dermaler Zwischenzellflüssigkeit

„Der Interzellulärraum oder das Interstitium ist jener Teil des Flüssigkeitsvolumens des Körpers, der nicht in Zellen eingeschlossen ist (siehe Abb. 3) und dessen Volumen eine Größe von 12 bis 15 Liter einnimmt. Diese Flüssigkeit wird auch interstitielle Flüssigkeit (ISF) genannt und unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung von der intrazellulären Flüssigkeit und auch von Blutplasma. Diese Flüssigkeiten stehen jedoch über Membranen miteinander in Kontakt und erlauben einen ständigen Austausch von Substanzen zwischen Zellen und Kreislaufsystem über komplexe Mechanismen.“, aus [13]

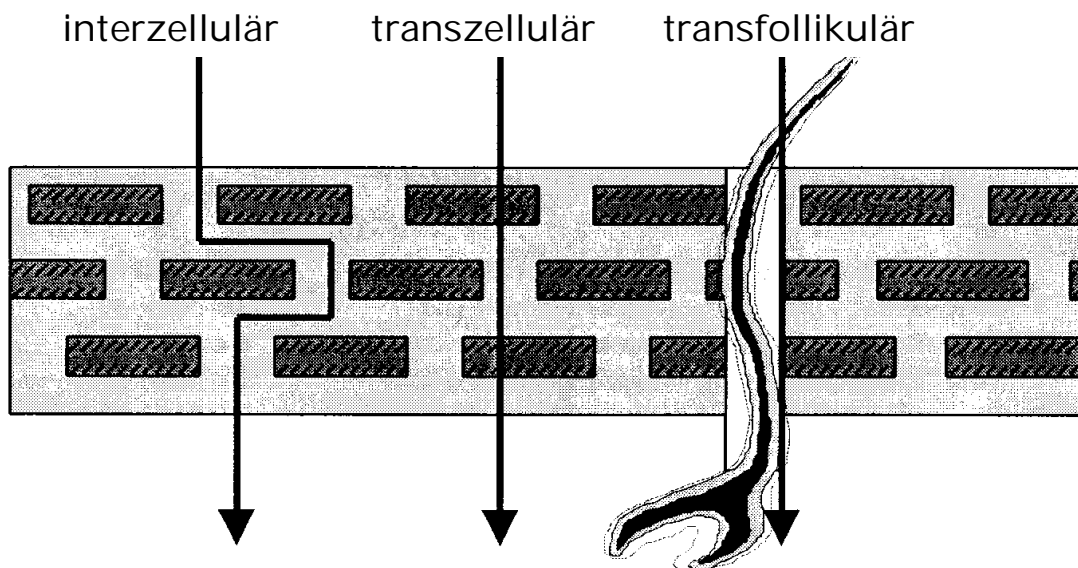


Abb. 3 Transportwege durch die Haut [4]

Die Kinetik der Hautpenetration neuer topischer Therapeutika ist in vielen Fällen nicht oder nur teilweise untersucht. Bisher wurde die Penetrationskinetik mit zeitlich aufeinanderfolgenden Hautbiopsien bestimmt. Dieser Eingriff, der unter Umständen auch Narben hinterlässt, wird von den Probanden bzw. Patienten nicht oder nur eingeschränkt toleriert. Wenn eine solche Penetrationskinetik vorliegt, so ist diese für gewöhnlich nur bei gesunden Probanden bestimmt worden. Die Penetration von topisch aufgetragenen Wirkstoffen ist theoretischen Überlegungen zufolge bei Psoriasispatienten in läsionalen und schuppenflechtefreien Hautarealen unterschiedlich. Möglicherweise besteht sogar ein Unterschied in der Penetrationskinetik zwischen nicht läsionaler Haut

von Psoriasispatienten und normaler Haut von gesunden Probanden. Diese Unterschiede sind nicht untersucht.

Biopsie

Mit einem Biopsiemesser werden Proben (Biopsien) aus der Haut gestanzt und mit einer Schere vom darunterliegenden Muskelgewebe getrennt. Biopsien sind invasiv, aber bei der Entnahme schmerzlos, da sie unter lokaler Betäubung entnommen werden. Die Entnahme des Hautzylinders von 3 mm Durchmesser trägt ein Risiko für lokale Infektionen und daher wird die Entnahmestelle sofort mittels Verband abgedeckt. Beim Heilen des Stückes fehlender Kutis kann es zu einer überschießenden Narbenbildung kommen.

Die Methode lässt nur wenige Probenentnahmen pro Patient zu. Biopsien sind immer Momentaufnahmen über den Zustand des entnommenen Gewebes. Zeitliche Konzentrationsverläufe und pharmako-kinetische Profile lassen sich damit nicht erstellen.

Suction Blister

Mit einer kleinen Vakuumpumpe, die eine Schablone (Gesamtdurchmesser 20-50 mm) mit vielen Löchern (Durchmesser 3-10 mm) mit Unterdruck (150-300 mmHg) gegen die Haut presst, wird die Epidermis von der Dermis gelöst. In 2-3 Stunden entsteht dabei eine Blase (engl. Blister), die sich mit dermalen Zwischenzellflüssigkeit füllt [7]. Die Methode ist wenig invasiv und schmerzfrei, hinterlässt aber oft Stellen mit veränderter Pigmentierung. Sie wird hauptsächlich verwendet, um Wundheilungsprozesse zu untersuchen.

Tape stripping

„Tape Stripping“ ist eine einfache und effiziente Methode, um die Pharmakokinetik und Eindringtiefe in die Haut von topisch applizierten Substanzen zu bestimmen [5]. Bei dieser Methode wird durch das Aufkleben und anschließendem Abziehen von Klebestreifen das Stratum corneum schichtweise abgetragen. Dieser Vorgang wird mit weiteren Klebestreifen sequentiell wiederholt. Die Menge des abgetragenen Stratum corneums wird

durch Abwägen des Klebestreifens vor und nach dem Abziehen bestimmt. Die abgetragene Haut wird mit standardisierten chemisch-analytischen Methoden auf die topisch applizierte Substanz untersucht und so deren penetrierte Menge ermittelt.

Tape Stripping in seiner standardisierten Form eignet sich zum Bestimmen der Dermatopharmakokinetik von topisch applizierten Substanzen [8]. Seine Anwendungsmöglichkeit bleibt auf die Epidermis bzw. das Stratum corneum beschränkt. Tape stripping kann keine Konzentrationen in der Dermis nachweisen.

Die Mikrodialyse (MD) und die kapillare Ultrafiltration (membranbasierte Kathetermethoden) [12], [13]

Im Gegensatz zu den obengenannten Methoden, die einen direkten Weg durch die Haut gehen, handelt es sich bei Mikrodialyse und kapillarer Ultrafiltration um zwei Methoden, mit denen man sich durch Implantieren eines Katheters Zugang zur dermalen Zwischenzellflüssigkeit (ISF) verschafft. Kapillare Ultrafiltration zielt darauf ab durch Absaugen ISF zu sammeln. Es scheint, dass kapillare Ultrafiltration gegenüber der Mikrodialyse ziemlich an Bedeutung verloren hat. Mikrodialyse sammelt verdünnte ISF bzw. dialysierte ISF indem ein Perfusat durch einen mit einer Membran versehenen Katheter gepumpt wird. Dies kann durch einen Doppellumenkatheter geschehen, der im Kern das Perfusat bis zur Katheterspitze führt und anschließend im Mantel des Katheters, der nur durch eine Membran vom dermalen Zwischenzellraum getrennt ist, abführt. Dieser Rückfluss kann sowohl aktiv („Pull“) als auch passiv sein. Bei der dermalen Anwendung der Mikrodialyse wurde auch schon ein linearer Katheter angewendet. Hierbei wird der Katheter oberflächlich durch die Haut gezogen. Zwischen der Ein- und Austrittsstelle der Haut befindet sich die Membran. Jeder membranbasierende Katheter wird mit einer Ausschlussgrenze oder „Cut-off“ definiert, die MWCO (molecular weight cut-off) genannt wird und in Dalton (Da) angegeben ist.

Sowohl die Mikrodialyse als auch die kapillare Ultrafiltration sind durch die Verwendung einer Membran und die damit verbundenen Adsorptionseffekte für großmolekulare und lipophile Substanzen nicht geeignet [9]. Schnetz und

Fartasch [10] haben verschiedene Probleme genannt, die beim Sammeln von lipophilen und stark-proteingebundenen Substanzen mit der Mikrodialyse auftreten. Mikrodialyse ist nicht geeignet zum Sammeln von hoch lipophilen Substanzen [11].

Die dermale offene Mikroperfusion (OFM) (membranfreie Kathetermethode)

Die dermale offene Mikroperfusion ist eine minimal-invasive kontinuierliche Samplingtechnik, die den direkten Zugang zur dermalen Zwischenzellflüssigkeit ermöglicht. Ihre Funktionsweise ist ähnlich der Mikrodialyse, aber als membranfreie Methode ist sie im Gegensatz zur MD nicht auf kleine Moleküle und Ionen beschränkt.

Die OFM eignet sich dafür, die Penetrationskinetik von Wirkstoffen durch die Epidermis kontinuierlich zu messen. Sie öffnet den Weg für die In-vivo-Forschung von großmolekularen, lipophilen und protein-gebundenen Substanzen. Sie bietet die Möglichkeit, die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines lokal auf der Haut aufgetragenen dermatologischen Produktes zu untersuchen. Bislang wurden solche Substanzen nur punktuell mittels Hautbiopsien gemessen. Durch den Einsatz des neuen dermalen Samplingsystems sollte innerhalb von dermatologischen Studien ein deutlich höherer Informationsgewinn möglich sein, sodass Studienaufwand und Teilnehmerzahlen gesenkt werden können.

Ausserdem ist es möglich pharmakodynamische Parameter eines Wirkstoffes, wie z.B. die Beeinflussung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine) durch ein Lokalthapeutikum, mit Hilfe der Mikroperfusionstechnik zu bestimmen. Eine Untersuchung in diese Richtung führten Averbek et al [14] durch, die mittels Mikrodialyse, welche der Mikroperfusion sehr ähnlich ist, die lokale Freisetzung mehrerer pro-inflammatorischer Zytokine nach UVB-Bestrahlung der Haut in der dermalen Zwischenzellflüssigkeit detektiert haben.

Die OFM hat das Potential als sehr universelle Samplingmethode bei kontinuierlichen Konzentrationsbestimmungen in der Haut eingesetzt zu werden und könnte die Voraussetzungen und notwendigen Anforderungen der regulatorischen Behörden erfüllen.

In dieser Arbeit soll die Penetrationskinetik einer lipophilen Substanz nach topischer Applikation über einen Gesamtzeitraum von einer Woche untersucht werden. Die parallele Messung von TNF-alpha (ein Zytokin) soll einen objektiven Nachweis der lokal auf das Immunsystem erzielten Wirkung liefern.

Der in dieser Arbeit verwendete Helix-Katheter wurde schon in [13] verwendet und auf seine Anwendbarkeit, Handhabbarkeit und Verträglichkeit getestet. Dabei konnten folgende Erfahrungen gemacht werden:

- Gute Implantierbarkeit, gute Verträglichkeit des Helix-Katheters
- Außerordentlich gute Reproduzierbarkeit zwischen Kathetern
- Erste humane Anwendungen erfolgreich verlaufen
- Sampling kleinmolekularer Substanzen in humaner Haut ist möglich
- Großmolekulare bioaktive Moleküle sind nachweisbar
- Sampling von lipophilen Substanzen durchführbar
- Pimecrolimus wird am Pumpschlauchmaterial Tygon adsorbiert

Übersicht der Molekülgrößen, die mittels der OFM nachzuweisen bzw. schon nachgewiesen wurden:

- Ketoprofen 250 Da (kleines Molekül, untersucht in [12])
- Pimecrolimus 810 Da ($\log P = 6$) (hoch-lipophiles, protein-gebundenes Molekül; in [13] Machbarkeitsstudie)
- „Wirkstoff“ 410 Da ($\log P = 3$) (lipophiles, protein-gebundenes Molekül; in dieser Arbeit nachzuweisen)
- TNF alpha 17 kDa – 51 kDa (in dieser Arbeit nachzuweisen)
- Albumin 68 kDa (Transportprotein für den „Wirkstoff“)

Dermales Samplingsystem basierend auf der offenen Mikroperfusion (in Verwendung bis Ende 2006)

Das bis dato verwendete Samplingsystem basierend auf der offenen Mikroperfusion sah folgendermaßen aus:

Eine Peristaltikpumpe (Gilson) stand neben dem Bett. In ihr wurde ein 80cm langer Pumpschlauch aus Tygon eingespannt, der das Perfusatbehältnis mit dem Mikroperfusionskatheter verband. Der dermale OFM-Katheter lag in der Haut implantiert und wurde durch einen zweiten 80 cm langen Pumpschlauch mit dem Probenbehältnis verbunden. Die beiden Pumpschläuche sind „Push“ für aktive Zufuhr und „Pull“ für aktiven Abtransport genannt worden.

Zusammengefasst bestand das Samplingsystem aus:

- Peristaltikpumpe „Minipuls 3“ (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
- Perfusatbehälter
- Pumpschläuche sowohl „Push“ als auch „Pull“
- Kontaktierrohrchen
- Dermaler Mikroperfusionskatheter
- Probenbehälter

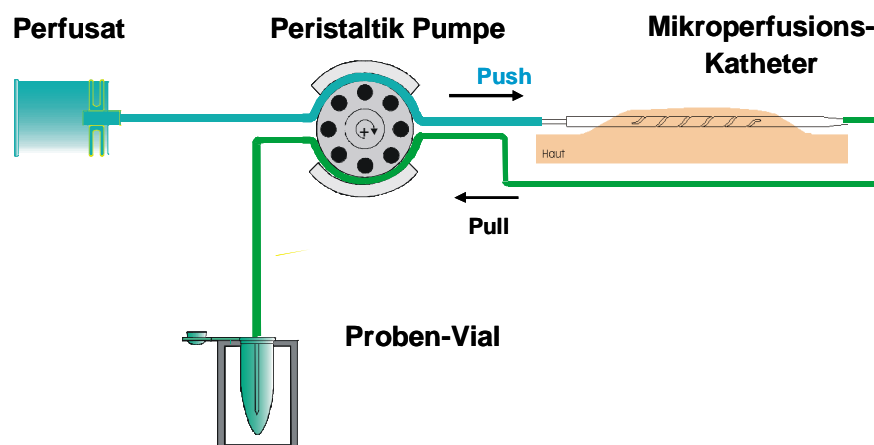


Abb. 4 Pumpkreislauf Push/Pull des „alten“ dermalen Samplingsystems mit OFM-Katheter (verwendet bis Ende 2006)

Vorteile:

- Dieses System wurde schon bei vielen klinischen Versuchen mit OFM- oder Mikrodialysekathetern erfolgreich verwendet. Es gibt viele Publikationen und Erfahrungswerte über die Anwendung der oben genannten Konfiguration.
- Mit der „Minipuls 3“ lässt sich die Flussrate gut kalibrieren.
- Das fluidische System war vom Perfusatbehältnis bis zum Probenbehältnis durchgehend geschlossen. Es herrscht eine durchgehende Flüssigkeitssäule, wodurch ein konstanter Fluss durch den Katheter erreicht wurde.

Nachteile:

- Es beinhaltet einen langen Pumpschlauch zum Katheter und ebenfalls einen langen Schlauch vom Katheter zum Sammelbehälter. Die Pumpschläuche waren lang (80cm) im Vergleich mit der Länge des Katheters (9cm).
- Die Probenflüssigkeit musste einen weiten Weg vom Katheter bis zum Probenbehältnis zurücklegen. Dies führte zu einer zeitlichen Verzögerung in Abhängigkeit der eingestellten Flussrate und des Pumpschlauchinnendurchmessers.
- Auf Grund der langen Schläuche und der schweren und großen Peristaltikpumpe war der Proband während der gesamten Versuchsdauer ans Bett „gebunden“.

Anforderungen an das dermale Samplingsystem

Attraktivität für den Patienten

Klinische Studien sind üblicherweise mit starken persönlichen Einschränkungen verbunden. Um Belastungen in physischer als auch psychischer Hinsicht zu minimieren, sollte das gesamte System tragbar sein und dem Probanden eine akzeptable Bewegungsfreiheit gewähren. Stand der Technik sind immobile Pumpen, die den Probanden während der gesamten Dauer der Untersuchung ans Bett „fesseln“. Weiters soll die tragbare Pumpe leiser werden und deren

Gewicht und ergonomisches Gehäuse den Bedürfnissen des Probanden entsprechen.

Leichte und effiziente Bedienbarkeit

Nach der Implantation des Katheters soll das Samplingsystem schnellstmöglich in Betrieb genommen werden, da es sonst zu Komplikationen wie zum Beispiel Blutgerinnung, Verlust der Sterilität uvm. kommen kann.

Samplen eines lipophilen Wirkstoffes

Die Salbe enthält einen immunoaktiven Wirkstoff, der auch die lokale Freisetzung von TNF-alpha beeinflussen sollte. Er passierte erfolgreich toxikologische Untersuchungen, wurde in Tierversuchen auf seine Verträglichkeit und Sicherheit getestet und war somit für klinische Studien zugelassen. Die Salbe ist ein nicht registriertes Arzneimittel und wird in dieser Arbeit „Wirkstoff“ genannt. Da sonst kein anderes Produkt getestet wurde, kann es zu keiner inhaltlichen Verwechslung kommen. In der klinischen Studie (2.3) soll er in der ISF gesammelt und im Labor gemessen werden.

Motivation und Aufgabenstellung

Die OFM wird schon länger erfolgreich im adipösen Fettgewebe benutzt [15]. Die dermale OFM steckt aber noch in den Kinderschuhen. Der erste verwendete dermale Katheter war aus Stahl und wurde in Tierversuchen getestet. Daraus entwickelte sich ein flexibler Katheter aus PTFE [12]. Dieser wurde in Tierversuchen weiterentwickelt zu einem Helix-Katheter (PTFE) [13], der bei der Studie über die Machbarkeit des Sammelns eines großmolekularen hochlipophilen Wirkstoffes (Pimecrolimus) verwendet wurde. Bisher wurde die dermale OFM in Tierversuchen und einzelnen Humanversuchen eingesetzt. Eine große klinische Humanstudie wurde noch nicht durchgeführt.

Die Machbarkeit und Durchführung von Konzentrationsmessungen in der Dermis und somit der Nachweis über das Vorhandensein einer Substanz im Zielgewebe wird von der Pharmaindustrie benötigt werden und zwar in einer breiten Produktpalette, die von Medikamente bis zur Sonnencreme reicht.

Bis jetzt wird die dermale OFM noch nicht als Standardmethode verwendet, um dermale Zwischenzellflüssigkeit zu sammeln, obwohl von der FDA seit kurzem ein Konzentrationsnachweis für topisch aufgetragene Wirkstoffe in der Haut gefordert wird. Die Mikrodialyse als Standardmethode zum Nachweis kleiner hydrophiler Moleküle findet zunehmend Verwendung und auch Anerkennung von Seiten der FDA [8]. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die FDA auch die Mikroperfusion anerkennen wird, sofern entsprechende Daten über die Anwendbarkeit und Validität in der Zukunft vorliegen.

Ziel dieser Arbeit ist es, das System für in vivo Humanstudien weiterzuentwickeln. Zunächst soll es in Voruntersuchungen für einen lipophilen, protein-gebundenen Wirkstoff evaluiert werden. Weiters sollen die Ergebnisse dieser Vorstudie ausgewertet und zur Anpassung und Optimierung des Systems herangezogen werden. Anschließend wird das dermale Samplingsystem zum Messen der Pharmakokinetik des Wirkstoffes in einer klinischen Studie benutzt. Eine Herausforderung an diese Studie ist die Testumgebung. Anstatt eines Tierversuches oder in-vitro Tests wird sie in läsionaler und nicht läsionaler Haut von Schuppenflechte-Patienten durchgeführt. Hierbei sei angemerkt, dass bei jedem Probanden sowohl der Ort der psoriatischen Plaques (z.B. Oberschenkel, Unterarm) als auch die Heftigkeit der Schuppen variieren können und werden.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Ist der Katheter im dermalen Zwischenzellraum applizierbar?
- Kann eine tragbare Minipumpe sowohl „Push“ als auch „Pull“ mit mehreren Kanälen betreiben?
- Kann eine lipophile topische Substanz in der dermalen Zwischenzellflüssigkeit (ISF) gesammelt werden und ist ihre Konzentration im Labor messbar?
- Sind Zytokine in der dermalen Zwischenzellflüssigkeit nachweisbar?

2 Material und Methoden

Diese Arbeit gliedert sich in drei Unterteile:

- Durchführung von Materialtests und Vorbereitungen um das „alte“ dermale Samplingsystem an die Anforderungen der klinischen Studie anzupassen (2.1)
- Beschreibung des optimierten und weiter entwickelten, tragbaren dermalen Samplingsystems (2.2)
- Durchführung einer klinische Studie mit dem (in 2.2) beschriebenen neuen System (2.3)

2.1 Anpassungen am dermalen Samplingsystem

Die Voruntersuchungen hatten das Ziel, das bestehende System (siehe Abb. 4) für die in der Einleitung genannten Anforderungen an das System anzupassen. Die speziellen Herausforderungen an das System und im Besonderen an den OFM-Katheter waren die hohe Lipophilität ($\log P = 3$) des Wirkstoffes und die geringen Flussraten ($0,25 \mu\text{l}/\text{min}$).

Daher mussten folgende Fragen geklärt werden:

- Tritt eine Adsorption des Wirkstoffes an den verwendeten Materialien auf? Wie groß ist ihr Einfluss auf die Messung der Konzentration?
- Ist ein kontinuierliches Sampling in vivo mit sehr geringen Flussraten $\leq 0,25 \mu\text{l}/\text{min}$ über 24 Stunden durchführbar?

Diese Fragen wurden in den Voruntersuchungen (2.1.1 bis 2.1.3) behandelt. Die Erkenntnisse aus den Voruntersuchungen führten zur Entwicklung eines neuen dermalen Samplingsystems (siehe 2.2). Der positive Abschluss der Voruntersuchungen war unter anderem die Voraussetzung für die Durchführung der klinischen Studie (siehe 2.3).

2.1.1 In vitro Adsorptionstest

In Vorbereitung für die klinische Studie (siehe 2.3) soll das Adsorptionsverhalten des Wirkstoffes mit den verwendeten Materialien untersucht werden. Bei der geplanten Schlauchkonfiguration kommt der Wirkstoff mit dem Pumpschlauch, dem Katheter und dem Probenbehälter in Kontakt.

Ziel der Untersuchung war die Beantwortung folgender Fragen:

- Nimmt die Wirkstoff-Konzentration auf Grund von Adsorption am Tygon-Pumpschlauch oder am Teflon-Katheter ab?
- Kommt es zu einer Adsorption am Probenbehälter?

(Dieser Test wurde vom analytischen Labor durchgeführt und wird hier nicht weiter behandelt.)

Getestete Schlauch-Materialien

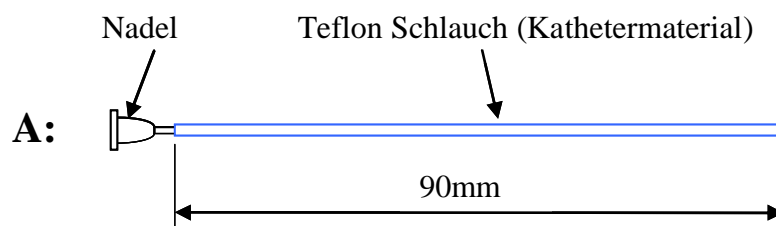


Abb. 5 System A: Teflon Katheter (Innendurchmesser (ID) 0,2 mm, L 90 mm)

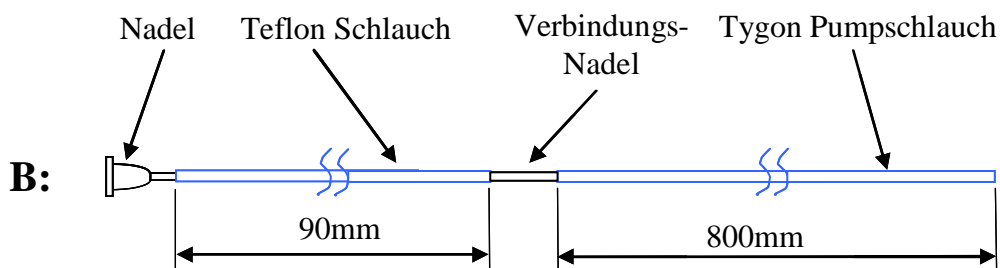


Abb. 6 System B: Teflon Katheter (ID 0,2 mm, L 90 mm) mit direkt verbundenem Tygon Pumpschlauch (ID 0,19 mm, L 800 mm)

Getestetes Perfusat

Perfusat 1: 10 ml (1 ng/ml Wirkstoff Konzentration in ELO-MEL gelöst)

Perfusat 2: 10 ml (0,2 ng/ml Wirkstoff Konzentration in ELO-MEL gelöst)

Das Perfusat wurde am Tag der Studie vom analytischen Labor hergestellt.

Verwendete Materialien

- zwei „CMA 107“ Spritzenpumpen (CMA Microdialysis AB, Solna, Schweden)
- Beschriftete und abgewogene Probenbehälter
- Laborwaage
- Injektionsnadel (BD Microlance 3, 0,3 x 13 mm 30G½'')
- ELO-MEL 500 ml isotonische Infusionslösung (Fresenius Kabi, Graz, Österreich)

Übersicht Tagesablauf

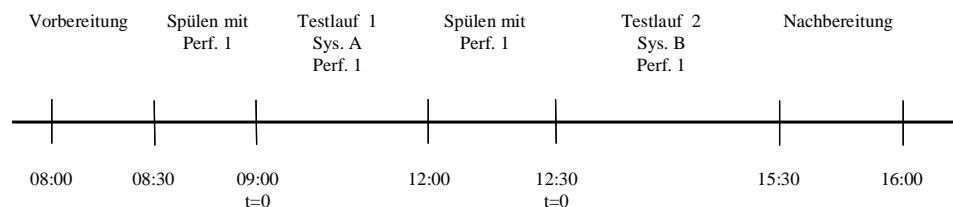


Abb. 7 Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Tests

Am Tag1 wurden folgende Tests mit Perfusat 1 durchgeführt:

Testlauf 1: 3 x 60 min Samplen mit System A und Perfusat 1

Testlauf 2: 3 x 60 min Samplen mit System B und Perfusat 1

Am Tag2 wurden folgende Tests mit Perfusat 2 durchgeführt:

Testlauf 3: 3 x 60 min Samplen mit System A und Perfusat 2

Testlauf 4: 3 x 60 min Samplen mit System B und Perfusat 2

Tagesablauf Tag1

Zwei Schlauchsysteme vom Typ A wurden mit den beiden CMA 107 Pumpen verbunden. Diese wurden mit Perfusat 1 gefüllt und 5 Minuten mit einer Flussrate von 2 µl/min betrieben, um die Luft aus dem System zu bekommen. Dann wurde die Flussrate auf 0,25 µl/min eingestellt und eine Stunde gesammelt, um ein Referenzvolumen zu erhalten. Die Probe wurde gewogen und das Volumen unter der Annahme 1 mg = 1 µl bestimmt.

Um 9:00 wurden die Probenbehälter gewechselt und Testlauf 1 konnte beginnen. Im Abstand von je einer Stunde wurden die Probenbehälter gewechselt, gewogen und sofort tiefgefroren. Um 12:00 endete Testlauf 1.

Anschließend wurde System A von den Pumpen entfernt und zwei Schlauchsysteme vom Typ B an die Pumpen angeschlossen. Die Systeme wurden mit dem Perfusat 1 geflutet bis das Schlauchsystem voll war und die letzte Luftblase verschwand. Um 12:30 wurden die Probenbehälter getauscht und Testlauf 2 begann. Nach dem dritten Probenwechsel wurde das Sampling mit Perfusat 1 beendet und die insgesamt 12 tiefgefrorene Proben wurden ins Labor gebracht.

Tagesablauf Tag2

Der Ablauf am Tag2 verlief analog zu Tag1. Anstelle von Perfusat 1 wurde Perfusat 2 verwendet.

Analytik und Auswertung

Die Quantifizierung des Wirkstoffes in den Proben wurde mit einer validierten cap-HPLC/MS/MS Methode gemäß „Bioanalytical Method Validation, May 2001“ (FDA Guidance for Industry) durchgeführt (siehe Tabelle 1). Diese Methode vereint eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer Massenspektrometrie (MS). Dabei dienen der Chromatograph zur Auftrennung und das Massenspektrometer zur Quantifizierung des Wirkstoffes.

Eine mögliche Adsorption am Probenbehälter wurde vom analytischen Labor getestet. Die Behälter wurden mit Wirkstoffkonzentrationen von 1ng/ml und 100ng/ml befüllt und nach 4 Stunden analysiert (siehe 3.1.1).

Analysemethode	Cap-HPLC/MS/MS
Analysegerät HPLC	Agilent Cap-HPLC
Analysegerät MS	ABI Qtrap 4000
Probenmenge	>10 µl
Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)	0,1 ng/ml Wirkstoffkonzentration
Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ)	100 ng/ml Wirkstoffkonzentration

Tabelle 1 Eckdaten zur Konzentrationsmessung des Wirkstoffes

2.1.2 In vivo Flussratentest

Aus der Untersuchung über das Adsorptionsverhalten (siehe 2.1.1) der verwendeten Materialien wurde deutlich, dass ein Kontakt zwischen dem Wirkstoff und dem Pumpschlauch aus Tygon absolut vermieden werden muss (siehe 3.1.1). Die Untersuchung ergab, dass 78 - 94% des Wirkstoffes im Pumpschlauch aus Tygon adsorbiert wurden. Daher muss bei der Konfiguration des fluidischen Systems angepasst werden.

In der folgenden Untersuchung soll der Katheter ohne Pull-Zweig der Pumpe betrieben werden. Sogenanntes „Schwerkraft-Sampling“ wurde schon in [13] angewandt, um eine Adsorption des hochlipophilen Pimecrolimus am Pumpschlauchmaterial zu umgehen. Damals wurden Pimecrolimus Konzentrationen zwischen 97,6 – 12500 ng/ml bei einer Flussrate von 1 µl/min während einer Samplingdauer von 6 Stunden nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass eine Flussrate von 1 µl/min zu hoch sei, um einen ausreichenden Austausch zwischen dermalen Zwischenzellflüssigkeit und Perfusat zu gewährleisten. Durch Optimierungen der Laboranalytik und „poolen“ von drei Kathetern kann die Flussrate auf 0,25 µl/min gesenkt werden. Die für das Labor notwendige Probenmenge von 30 µl soll 24 Stunden lang jede Stunde erreicht werden können.

Im Unterschied zu [13] soll hier die Machbarkeit von „Schwerkraft-Sampling“ bei einer geringeren Flussrate (0,25 µl/min), einer geringeren Wirkstoffkonzentration (1 ng) und einer längeren Versuchsdauer (Samplingdauer = 24 Stunden) überprüft werden.

Ziel der Untersuchung war die Beantwortung folgender Fragen:

- Kann die dermale OFM mit einer Flussrate von 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ in vivo angewendet werden?
- Ist ein „Schwerkraft-Sampling“ (nur Push-Modus) bei dieser geringen Flussrate 24 Stunden lang durchführbar?
- Geht beim „Schwerkraft-Sampling“ Perfusat an die Dermis verloren?

Verwendetes System „Schwerkraft Sampling“

Das System bestand aus

- 6 Perfusatbehältern
- 2 Peristaltikpumpen „Minipuls 3“ (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
- 6 Pumpschläuchen Push
- 6 Kathetern
- 6 Probenbehältern

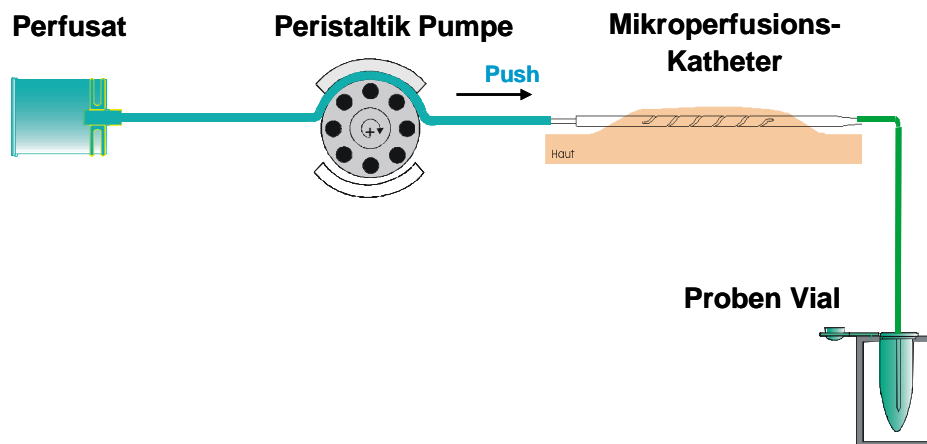


Abb. 8 System „Schwerkraft Sampling“, ein reines Push-System

Vorteile des Systems „Schwerkraft Sampling“

- Kurzer Weg zwischen Katheter und Probenbehälter
Geringere Sampling-Verzögerung der Probenflüssigkeit
Verminderte Adsorptionsmöglichkeiten
- Konnte schon eine hochlipophile Substanz (Pimecrolimus) nachweisen [13]

- Nur Push Modus: Kürzerer Kontakt mit Pumpkopf und somit geringere Reibung und Fehlerquelle

Nachteile des Systems „Schwerkraft Sampling“

- Keine Kontrolle über die effektive Flussrate
- Sampling nur unter Einfluss und Berücksichtigung der Schwerkraft möglich → Patient darf seine Position nicht verändern (24 Stunden!)
- Nicht tragbar

Verwendete Materialien

- zwei Peristaltikpumpen „Minipuls 3“ (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
- 6 (10) sterile dermale OFM-Katheter (Innendurchmesser ID = 0,2 mm, Aussendurchmesser AD = 0,4 mm, Länge = 9 cm davon 18 mm Helix)
- 12 (15) sterile Pumpschlauchsets (ID = 0,19 mm, L = 80 cm)
- Sterile Verbindungsröhrchen
- Perfusatbeutel
- Beschriftete und abgewogene Probenbehälter
- Laborwaage
- ELO-MEL 500ml isotonische Infusionslösung (Fresenius Kabi, Graz, Österreich)
- 2 sterile Nadelhalter
- 2 sterile Scheren
- 2 sterile Pinzetten
- 1 steriler OP-Marker
- Op-Tücher
- Sterile Nierenschalen
- Sterile Handschuhe
- Wundkompressen

Perfusat

20 % Eigenblutserum der Testperson + 80 % isotonische Infusionslösung (ELO-MEL)

Testablauf

Es soll 24 Stunden lang Probenflüssigkeit gesammelt werden. In den ersten 4 Stunden wird ein Sample-Interval von 60 min gewählt, danach 120 min. Somit beträgt die Anzahl der Messungen (=Probenanzahl) 84, je 14 Samples pro Katheter (6 Katheter).

Vorbereitung

Der Unterarm des Probanden wurde an zwei Stellen rasiert und mit Isopropanol desinfiziert. Der Ein- und Austrittspunkt des Katheters wurde mit dem sterilen OP-Marker in einem Abstand von 30 mm markiert. Je 3 OFM-Katheter wurden vom Dermatologen im Abstand von ca. 2 cm in der Epidermis gesetzt. Nach dem Setzen wird der Katheter mit desinfizierten Tygon-Stoppringen (ID 0,5 mm) fixiert. Danach wurde die Setznadel vom Katheter getrennt und das Endstück in einen Probenbehälter gesteckt. Der Katheter wurde dann mit einer Spritze voll ELO-MEL gespült, um einen „Fluss“ aufzubauen und um ihn von Blut, das während des Setzens in den Katheter gekommen war, zu befreien. Anschliessend wurde die Spritze entfernt und stattdessen ein steriler Pumpschlauch, der zuvor mit ELO-MEL gespült worden war, mittels eines Verbindungsröhrchens mit dem Katheter verbunden. Nach einer Spülphase von 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 µl/min kann mit dem Sampling begonnen werden. Die Pumpen werden auf eine Flussrate von 0,25 µl/min gestellt und der zuvor abgewogene und für die erste Stunde beschriftete Probenbehälter untergestellt. Bei jedem Probenwechsel wurde die gewonnene Probe abgewogen, dann verschlossen und eingefroren (-20°C). Nach 4 Stunden wurde das Sampling-Interval von 60 min auf 120 min geändert.

In der 14. Stunde zwang der Ausfall aller Katheter zum Abbruch des Schwerkraft-Samplings (siehe 3.1.2 Abb. 24). Um den Flussratentest abzuschließen, wurde das fluidische System von Schwerkraft-Sampling-Betrieb wieder in ein Push-Pull-System umgebaut (so wie in Abb. 4). Nach zwei Stunden konnte das Sampling wieder aufgenommen werden. Die folgenden Stunden wurde ein Sampling-Interval von 120 Minuten gewählt. Das allerletzte Sampling-Interval war 60 Minuten.

2.1.3 In vivo Vorversuch mit Proben-Sammel-System und Minipumpe

Bei sehr geringen Flussraten ($\sim 0,25 \mu\text{l}/\text{min}$) hat abgesehen vom Innendurchmesser des Pumpschlauches auch die Schlauchlänge Einfluss auf die Flussdauer der Probenflüssigkeit vom Katheter bis zum Probenbehälter. Um die Flussdauer und somit die Verzögerung so gering wie möglich zu halten, wurde ein Proben-Sammel-System mit auswechselbaren Einweg-Glaskapillaren entwickelt. Weiters führten die Ergebnisse der vorangegangenen Tests (siehe 3.1.2) zur Entwicklung einer tragbaren Mini-Peristaltikpumpe. So können die Pumpschläuche sowohl „Push“ als auch „Pull“, die die Pumpe mit dem Katheter und das Proben-Sammel-System wiederum mit der Pumpe verbinden, viel kürzer gehalten werden. Dadurch wurde das Sampling mit geringen Flussraten bei gleichbleibendem Innendurchmesser erst möglich. Außerdem kann den Anforderungen an das System („Tragbar“) und an die klinische Studie („Stündliches Sammeln von Probenflüssigkeit bei einer Flussrate von $0,25 \mu\text{l}/\text{min}$ “) entsprochen werden.

Folgende Arbeiten waren durchzuführen:

- Das neue tragbare System testen und eine Problemliste erstellen
- Handgriffe üben, um Fehlerquellen zu vermindern
- System für die klinische Studie optimieren
- Schon bekannte Arbeitsschritte und Handgriffe beschleunigen, um eine Verklumpung/Koagulation im Helix-Katheter zu vermeiden
- Gesammelte Proben im Labor auf TNF-alpha testen

Verwendetes System „Tragbares System“ mit Minipumpe

Das System beinhaltet

- Perfusatbehälter
- Tragbare Mini-Peristaltikpumpe (JOANNEUM RESEARCH HEALTH, Graz)
- Pumpschläuche Push und Pull
- Katheter
- Probenbehälter
- Neues Proben-Sammel-System (JOANNEUM RESEARCH HEALTH, Graz)

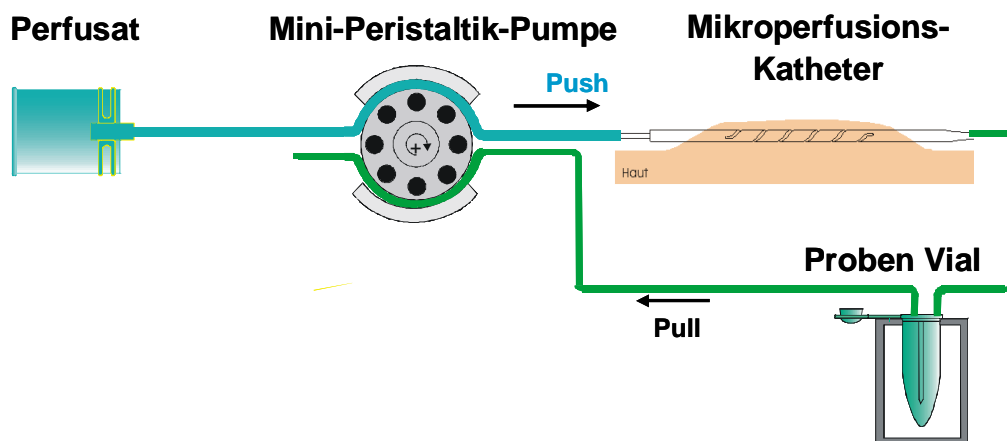


Abb. 9 Pumpenkreislauf des tragbaren dermalen Samplingsystem

Vorteile „Tragbares System“

- Kurzer Weg für Probenflüssigkeit (schneller, weniger fehleranfällig)
- Probenabnahme so nah wie möglich am zu messenden Ort
- Ausfluss in der Glaskapillare schnell ersichtlich und kontrollierbar
- Tragbar mit Minipumpe

Nachteile „Tragbares System“

- Neues System (keine Erfahrungswerte)
- Aufwändige Fixierung am Körper
- Wenig Platz zwischen den Unterteilen
- Unübersichtlicher Pumpschlauch- und Katheterverlauf

Analytik und Auswertung

Die Quantifizierung von TNF-alpha in den Proben wurde mit einem hochsensitiven humanen TNF-alpha ELISA Quantikine HS Kit (R&D Systems) durchgeführt. Das ELISA wurde auf den Bereich zwischen LLOQ und ULOQ optimiert und für die Samplmatrix validiert. (siehe Tabelle 2)

Analysemethode	Human TNF-alpha ELISA Quantikine HS kit (R&D Systems)
Probenmenge	>10 µl
Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)	9,7 pg/ml TNF-alpha Konzentration
Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ)	155 pg/ml TNF-alpha Konzentration

Tabelle 2 Eckdaten zur Konzentrationsmessung von TNF-alpha

2.2 Das dermale Samplingsystem

Anforderungen an das System

Zur Messung lipophiler Substanzen in den Zwischenzellräumen der Haut (Interstitium) wird ein System benötigt, das folgende Bedingungen erfüllt. Es wird eine Konfiguration des fluidischen Systems benötigt, das einen Kontakt zwischen der zu messenden Substanz und adsorbierenden Materialien (z.B. Tygon) verhindert.

Um eine messbare Menge Probenflüssigkeit zu sammeln, sollen mehrere Katheter parallel betrieben werden. Weiters muss mit einer sehr niedrigen Flussrate (0,25 µl/min) gesammelt werden, um eine messbare Konzentration zu erhalten. Diese niedrigen Flussgeschwindigkeiten führen dazu, dass die Schlauchlängen so kurz wie möglich gehalten werden sollen, um größere zeitliche Verzögerungen zu vermeiden. Das gesamte System muss daher in unmittelbarer Nähe der zu messenden Hautstelle platziert werden. Als äußerst positiv für den Probanden erwies sich, dass ein solches System tragbar ist.

Das tragbare dermale Samplingsystem besteht aus folgenden Komponenten:

- Dermaler OFM Katheter (2.2.1)
- Fluidisches System (2.2.2)
- Proben-Sammel-System (2.2.3)

2.2.1 Dermaler Mikroperfusionskatheter

Der dermale OFM Katheter entwickelte sich aus einem anfangs laserperforierten Stahlröhrchen [12] über einen linearen PTFE-Katheter [12] zu einem linearen Helix-Katheter (PTFE) [13] (siehe Abb. 10).

Die positiven Eigenschaften des PTFE OFM Katheters haben sich schon in [12] und [13] erwiesen: flexibel, gut implantierbar und günstig in der Produktion. Wegen seiner kleinen Abmessungen und der hohen Biokompatibilität löst er so gut wie keine Gewebereaktion aus. Bei Laktatmessungen konnte die sehr gute Hautverträglichkeit des Materials PTFE nachgewiesen werden [13].

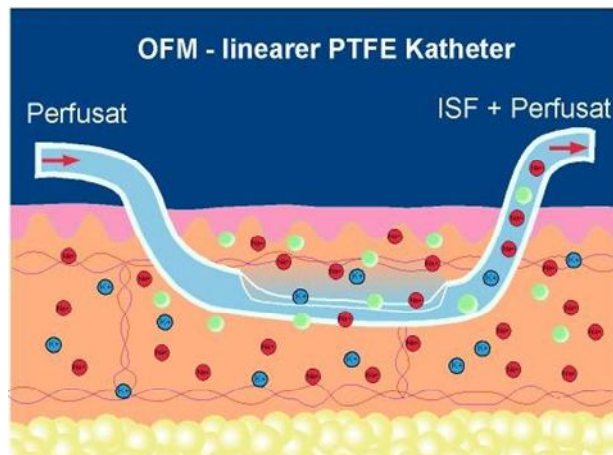


Abb. 10 Schema des linearen OFM-Katheter

Bei ersten in vivo Anwendungen im Menschen wurden diese Eigenschaften bestätigt. Auf Grund der geringen Abmessungen wurde der Katheter speziell für dermale Anwendungen als gut geeignet beschrieben [13].

Der als dermale OFM-Katheter verwendete Teflon-Schlauch ist 23 cm lang, hat einen Aussendurchmesser von 0,4 mm und einen Innendurchmesser von 0,25 mm. Dieser Schlauch wird über eine Länge von 30 mm implantiert. Die permeable Länge beträgt 18 mm und wird zentral unter der Haut positioniert. Damit der Mikroperfusionskatheter nicht verrutscht, wird er mit zwei Stoppringen, die sich 6 mm vor bzw. nach dem permeablen Stück befinden, bei den Austrittslöchern fixiert. Dieser Abstand zum Ein- bzw. Austrittslochs soll das in Tabelle 5 (siehe 3.1.3) als sehr problematisch beschriebene Ansaugen von

Luftbläschen verhindern. Mehrere Katheter unter einer Hautstelle liefern mehr ISF und dadurch erhält man ein stabileres Ergebnis und es kann eine größere Hautfläche untersucht werden.

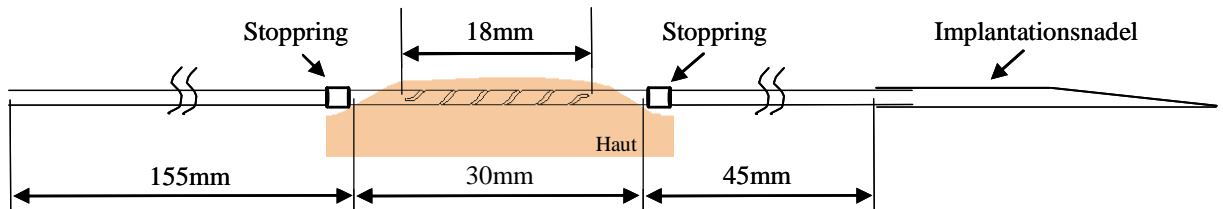


Abb. 11 Schema des Helix-Katheters

Bau des Katheters

Der BOLA PTFE Schlauch (Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) wird von einer 50 m Trommel abgerollt und nach 23 cm abgeschnitten. Anschließend wird das Stück auf eine Schablone gelegt, auf der die Position der zu implantierenden Stelle eingezeichnet ist. Das zu implantierende Stück soll sich in 4,5 cm Abstand von der Austrittsfläche und 15,5 cm vom Pumpschlauch entfernt befinden (siehe Abb. 11). Nun wird ein dünner Draht, der zuvor mit Ultraschall und UV-Sterilisator gereinigt worden ist, in den Schlauch eingeschoben. Bevor die Austauschfläche in den Katheter geschnitten wird, wird einer der beiden Stoppringe an die Stelle mit 15,5 cm Abstand zur Pumpseite geschoben. In der Mitte des zu implantierenden Abschnittes (30 mm Länge) werden 18 mm Schlauchoberseite mit einem Skalpell entfernt (siehe Abb. 10 und Abb. 11). Anschließend werden diese 18 mm mit einer Wärmelampe erhitzt. Wenn der Schlauch durch die Wärme formbar ist, wird er zu einer Helix gedreht, die beim Erkalten bestehen bleibt. Eine 4 cm lange Setznadel (Sterican oder Enosa) mit einem Außendurchmesser von 0,5 mm wird am Katheterende mit einer Zange festgecrimpt.

Der fertig gestellte Katheter wird in Steripacks verpackt. Drei verpackte Katheter werden zusammen mit dem fluidischen System, bestehend aus drei Pumpschläuchen und dem Perfusatbeutel, und mit einer Minipumpe in einem großen Steripack® luftdicht verpackt und unter einer UV-Lampe eine Stunde lang vorsterilisiert. Alle genannten Arbeitsschritte wurden in einer Laminar-Flow Werkbank durchgeführt.

Sterilisation des Katheters

Bei in vivo Versuchen gilt der Grundsatz, dass alle Teile und Stoffe, die die Haut durchdringen, steril sein müssen, um eine Gefährdung des Patienten auszuschließen. Der Katheter muss daher einer keimabtötenden Prozedur unterworfen werden.

Die für die Versuche verwendeten Systeme wurden in luftdicht verschlossenen Steripacks zur Sterilisation gebracht. Es wurde eine Gassterilisation mit Ethylenoxid (ETO-Sterilisation) durchgeführt. Dieses Gas tritt durch die Verpackung ein, sterilisiert den Inhalt und verflüchtigt sich später wieder. Keime können aber die Verpackung nicht durchdringen.

Setzen bzw. Implantieren des Katheters

Aus einem steril verpackten Samplingsystem wird der zusätzlich verpackte sterile dermale OFM-Katheter zur Implantation bereitgelegt. Die Applikationsstelle wird mit einem OP-Stift markiert und desinfiziert. Mit sterilen OP-Tüchern wird der Bereich um die Stelle abgedeckt. Der Dermatologe nimmt den Nadelhalter und schiebt die Setznadel durch die beiden markierten Punkte an der gewählten Hautstelle. Anschließend greift er die Setznadel an der Austrittsstelle und zieht den Katheter durch die Haut bis zum Stoppring. Wenn der Dermatologe die 3 Kathetern eines Systems gesetzt hat, kann der Katheter für den Betrieb vorbereitet werden. Er wird mit einem zweiten Stoppring, der dem Katheter übergestülpt wird, fixiert und weiters wird eine Silikondichtung auf den Schlauch geschoben. Dann werden die Setznadel und der Draht entfernt und der überschüssige Katheterschlauch 4 cm von der Austrittsstelle abgeschnitten. Dabei wird beachtet, dass 2-3 mm Schlauch aus der Silikondichtung herausstehen.

2.2.2 Fluidisches System

Das fluidische System ist ein Teilsystem bestehend aus:

- Mini-Peristaltikpumpe
- Pumpschlauch (Tygon® S-54-HL Medical Tubing)
- Perfusatbeutel

Folgende Anforderungen musste das System erfüllen

- 24 Stunden voll tragbar
- 6 Kanal Minipumpe mit einstellbaren Flussraten
- Flussrate von 0,25 μl /min einstellbar

Die Mini-Peristaltikpumpe

Die Mini-Peristaltikpumpe besteht aus Motor, Rotor mit 4 Walzen, Anpress-Stück, Schlauchführung und Versorgung. Aus den Erfahrungen der Voruntersuchungen ergab sich, dass als Schutz für die Pumpschläuche eine Plastikfolie zwischen dem Rotor und den Schläuchen positioniert werden muss.

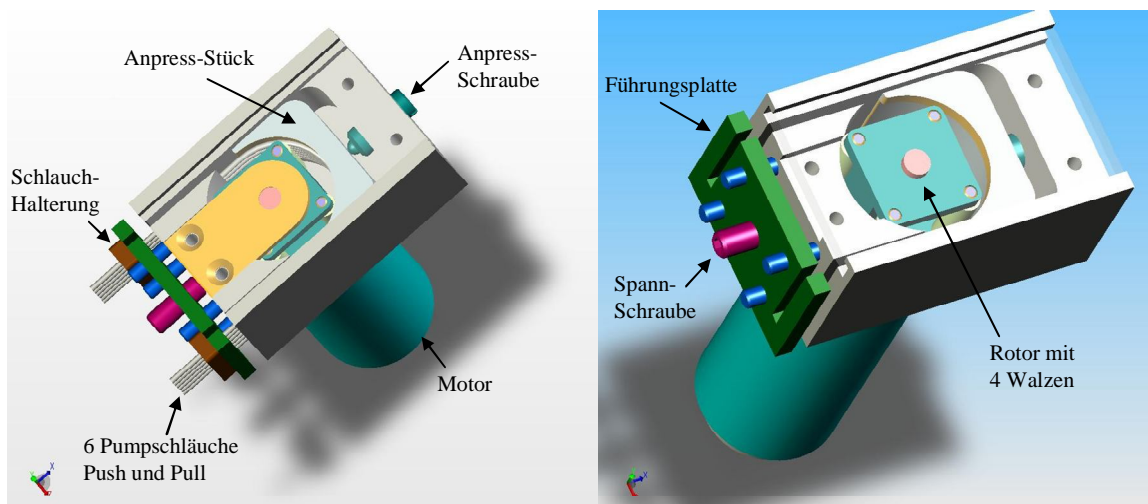


Abb. 12 Aufbau der Mini-Peristaltikpumpe (rechts ohne Pumpschläuche)

Das Anpress-Stück wird aus der Pumpe entfernt und die Plastikfolie kann um den Rotor gelegt werden. Anschließend werden die beiden Schlauchhalterungen in die Führungs-Platte eingelegt und die Schläuche um

den Rotor gelegt. Danach müssen sie mit der Führungs-Schraube leicht gespannt werden, damit sie nicht mehr verrutschen können. Nun wird das Anpress-Stück eingelegt und mit Hilfe der Anpress-Schraube werden die Schläuche zwischen Rotor und Anpress-Stück eingeklemmt (siehe Abb. 12). Dann kann die Pumpe in Betrieb genommen werden. Die Pumpe befindet sich in einem verschließbaren Gehäuse, in dem nebst Pumpe auch der Perfusatbeutel untergebracht wurde. Um die Tragbarkeits-Eigenschaften zu verbessern, wurde bei der Entwicklung der Pumpe und deren Gehäuse besonders auf Gewicht und Geometrie geachtet. Durch das geringe Gewicht kann die Pumpe mittels atmungsaktiver Klebefolie (Opsite) am Körper festgeklebt werden.

Pumpkreislauf

Für die Durchführung der klinischen Studie (2.3) muss entsprechend den Voruntersuchungen im Gegensatz zu den reinen Push-Systemen ein geschlossener Push-Pull-Kreislauf verwendet werden.

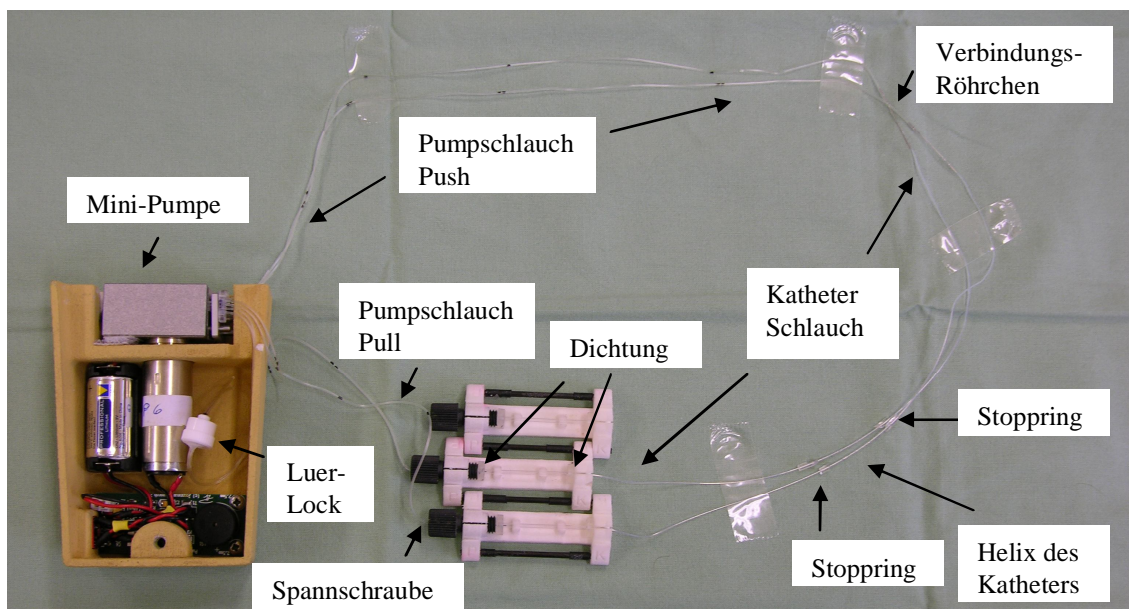


Abb. 13 Pumpkreislauf mit 2 Schlauchsystemen und 2 Kathetern

Der Perfusatbeutel wird mit einem Luer-Lock geschlossen in dem die 3 Pumpschlauchenden (Push) festgeklebt worden sind. Nach ca. 10 cm werden diese drei Pumpschläuche (Push) mit denen vom Proben-Sammel-System

zurückkommenden 3 Pumpschläuchen (Pull) in einer Halterung (siehe Abb. 12 braun) festgeklebt. Nach ca. 5 cm (entspricht der Länge im Pumpkopf) werden alle 6 Schläuche in einer zweiten Halterung festgeklebt. Diese 2 Halterungen liegen in der Führungsplatte (siehe Abb. 12 dunkelgrün), die mit Hilfe einer Schraube verstellbar ist. Anschließend an die zweite Halterung enden die 3 Pumpschläuche (Pull). Die 3 Pumpschläuche (Push) werden mit den Kathetern über Verbindungsröhrchen verbunden. Das andere Ende der Katheter wird mit übergeschobenen Silikondichtungen im Proben-Sammel-System eingelegt. Dort liegt die Glaskapillare, die mit der Spannschraube des Proben-Sammel-Systems, in deren Bohrung sich die 3 Pumpschläuche (Pull) mit übergeschobenen Silikondichtungen befinden, eingespannt wird. Nun ist der Pumpkreislauf geschlossen. Dabei ist zu beachten, dass sich auf der Push-Seite (Perfusatbeutel bis Glaskapillare) eine durchgehende Flüssigkeitssäule befindet und sich auf der Pull-Seite (nach der Glaskapillare bis zum Ende des Pumpschlauches) Luft im Schlauch befindet. Durch das Anpressen der Pumpschläuche im Pumpkopf ist der Pumpkreislauf komplett geschlossen.

Perfusat

Das Perfusat setzte sich aus einem Teil Eigenblut-Serum und vier Teilen ELO-MEL isotonische Infusionslösung (Fresenius Kabi Austria GmbH, A-8055 Graz) zusammen. (4:1 Perfusatlösung)

Calciumchlorid · 2H ₂ O	0,368 g
Kaliumchlorid	0,373 g
Magnesiumchlorid · 6H ₂ O	0,305 g
Natriumacetat · 3H ₂ O	6,124 g
Natriumchlorid	5,552 g

Elektrolyte in mmol/1000 ml

Na	140,0
K	5,0
Ca	2,5
Mg	1,5
Cl	108,0
Acetat	45,0

Osmolarität: 302 mosmol/l.

Abb. 14 Inhaltsstoffe von 1000 ml ELO-MEL isotonische Infusionslösung

Flussverzögerung

Flussraten, die durch Peristaltikpumpen in Pumpschläuchen hervorgerufen werden, werden im Wesentlichen durch die Pumpkopfdrehgeschwindigkeit und die verwendeten Schlauch-Innendurchmesser bestimmt. Der Abstand zwischen Katheteraustritt aus der Haut und Probensammelsystem betrug ~4 cm. Die Probenflüssigkeit benötigte für diese Strecke bei einer Flussrate von 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 6,54 Minuten. Diese Verzögerung musste beim Sammeln berücksichtigt werden.

2.2.3 Proben-Sammel-System

Das Proben-Sammel-System diente als Halterung für die Glaskapillaren. In diesen wurde die Probenflüssigkeit gesammelt. Es war so konzipiert, dass mehrere Katheter bedient werden konnten. Für die klinische Studie wurden drei Katheter pro Hautstelle in einem Proben-Sammel-System verwendet.

Das Proben-Sammel-System bestand aus:

- Kapillar-Halterung
- Glaskapillare 20 μl (Minicaps Einweg-Kapillare)
- Silikondichtung
- Spannschraube

Folgende Anforderungen musste das System erfüllen

- Klein und leicht
- Einfaches und schnelles Wechseln der Probenkapillaren
- Direkt bei der Implantationsstelle montierbar

Das verwendete Proben-Sammel-System bestand aus drei lasergesinterten Halterungen aus Polyamid (Rapid Product Development G.m.b.H., Industriestrasse Ost 7, 8605 Kapfenberg, Österreich).

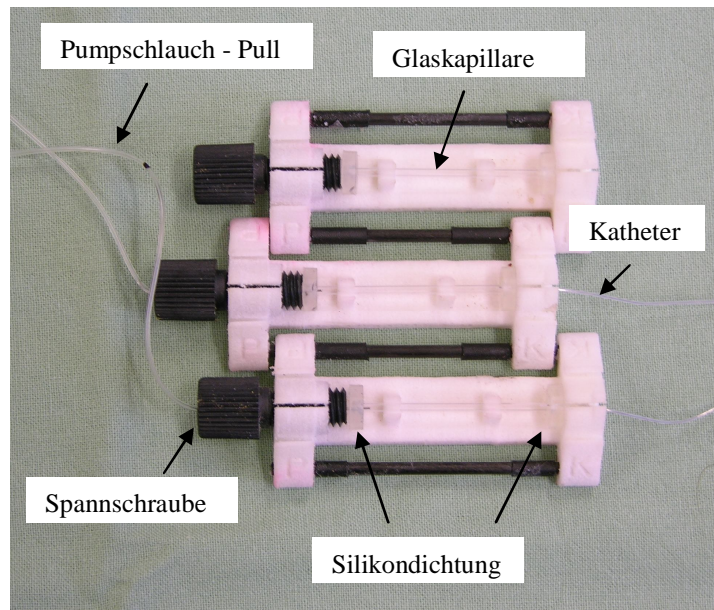


Abb. 15 Proben-Sammel-System mit 2 Kathetern

Die Halterungen wurden mit Metallstiften oder Kohlenstofffasern aneinander befestigt. Jede der weißen Halterungen besaß an der einen Seite ein Gewinde in der sich die Spannschraube befand (siehe Abb. 15). Durch diese Schraube, die in der Mitte hohl war, wurde der Pumpschlauch (Pull) mit einem Verbindungsröhrchen geführt und danach in eine Silikondichtung gesteckt, die genau in die Bohrung der Schraube passte. An der anderen Seite der Halterung befand sich eine leicht konische Vertiefung, in der das 4 cm lange vom Katheteraustritt kommende Teflon®-Schlauch-Stück, über das eine Silikondichtung übergestülpt worden war, lag. Sowohl die Gewindeöffnung als auch die Vertiefung verfügten über einen Schlitz, durch den die Schläuche ein und ausgelegt werden konnten, ohne das die Dichtungen entfernt werden mussten. Weiters befanden sich in der Mitte der Halterung zwei Auflagestützen (Steg), die das Hantieren mit den Glaskapillaren erleichtern sollten.

2.3 Klinische Studie

Diese Studie hatte zum Ziel, das Samplingsystem unter Praxisbedingungen zu testen und die daraus erhaltenen Resultate in dieser Arbeit zu evaluieren und diskutieren.

Es sollten die Penetrationseigenschaften eines Wirkstoffes in läsionaler Haut im Vergleich zu nicht läsionaler Haut bei Patienten mit Psoriasis (Schuppenflechte) untersucht werden. Die gewählte Dosis der Salbe sollte eine ausreichende Penetration in die Dermis der Haut ermöglichen, sodass der Konzentrationsverlauf in der dermalen Zwischenzellflüssigkeit mittels Mikroperfusionstechnik und einer später durchgeführten hochsensitiven bioanalytischen Methode detektiert werden konnte. (Pharmakokinetik)

Auf Grund der Erkrankung sollte die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins TNF-alpha in der psoriatischen Haut erhöht und somit messbar sein, sodass die inhibierenden Eigenschaften des applizierten Wirkstoffes auf den TNF-alpha Spiegel untersucht werden konnten. (Pharmakodynamik)

Diese Studie sollte Informationen zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern des Wirkstoffs liefern. Sie sollte aber auch grundlegende Antworten auf Fragen zu in vivo Penetrationseigenschaften topisch applizierter lipophiler Wirkstoffe in psoriatischer Haut geben können.

Hauptziele der Studie:

- Durchführung von 24 Stunden in vivo Studien im Menschen mit dem tragbaren dermalen Samplingsystem
- Nachweis eines topisch applizierten, stark lipophilen Wirkstoffes und Bestimmung seiner Konzentration in der dermalen Zwischenzellflüssigkeit mittels der offenen Mikroperfusion

Nebenziele:

- Ermittlung der Pharmakokinetik der Substanz nach der topischen Applikation des Wirkstoffes in läsionaler vs. nicht läsionaler Haut und vor Behandlungsbeginn vs. nach 1-wöchiger Behandlung von der psoriatischen Hautstelle
- Bestimmung der Konzentration von lokal freigesetztem TNF-alpha in läsionaler vs. nicht läsionaler Haut
- Ermittlung eines möglichen pharmakodynamischen Effektes der topisch applizierten Substanz auf die lokale TNF-alpha Freisetzung
- Bestimmung der Konzentration des Wirkstoffes in läsionaler vs. nicht läsionaler Haut mittels Biopsie

Die klinische Studie wurde im clinical research center (CRC) des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung (ZMF) der Medizinischen Universität Graz (MUG) durchgeführt und stand mit seinen Versuchsräumlichkeiten und unterstützenden Personal zur Verfügung. Durch einen Untervertrag mit der Medizinischen Universität (Zentrum für Medizinische Forschung und Abteilung Dermatologie und Venerologie) kann HEALTH neben der Samplingtechnologie und der Analytik, auch als Gesamtanbieter einer medizinischen Studie auftreten. Die MUG liefert Infrastruktur sowie das Medizinische Know-How in den Bereichen Dermatologie und Interne Medizin.

2.3.1 Studienteilnehmer

Die Suche nach Studienteilnehmer erfolgte durch Rekrutierung von Patienten der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Medizinische Universität Graz. Zwölf freiwillige Probanden, die an Schuppenflechte leiden, nahmen an der Studie teil.

Die Probanden S01 bis S03 wurden in einer Vorstudie mit kürzerem Protokoll getestet. Die Ergebnisse wurden benötigt, um das finale Protokoll zu erstellen. Sie sind nicht Inhalt dieser Arbeit.

Die Probanden S04 bis S12 nahmen an der 13-tägigen Studie (in dieser Arbeit beschrieben) teil. Ihnen wurde vor der Screening-Untersuchung nachweislich die Probandeninformation zur Verfügung gestellt. Die Teilnehmer wurden im Rahmen eines Informationsgespräches aufgeklärt. Nach eingehender Erklärung des Studienablaufes werden die Teilnehmer nach Unterfertigung der Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen.

Folgende Kriterien mussten sie erfüllen, um eingeschlossen werden zu können:

- Männliche und weibliche Probanden zwischen 18-75 Jahren bei guter Gesundheit, die anhand ihrer medizinischen Vorgeschichte, Tests über physische und vitale Körperfunktion, EKG und diverser Labortests keine klinischen Abnormalitäten aufweisen
- Gebärfähige Frauen sind auszuschließen
- Seit mindestens 6 Monaten vorhandene Diagnose von stabiler Plaque-Typ Psoriasis mit oder ohne Arthritis. Die Stellen der Plaques müssen für die Mikroperfusions-Untersuchung zugänglich sein. Andersartige bzw. Medikamenten induzierte Psoriasis darf nicht vorhanden sein
- Seit mindestens einem Monat ohne jegliche Behandlung, die Einfluss auf die Plaque-Typ Psoriasis, TNF-alpha oder zu untersuchende Hautstellen hat
- Verzicht seitens des Teilnehmers auf Sonnenbaden oder Sonnenexposition während der Studiendauer

2.3.2 Studienprotokoll

Der Studienablauf für die 9 Teilnehmer im Detail

Mikroperfusionsvisite 1 (Untersuchungstag 1-2)

Der Psoriasis-Patient wurde mit einer Creme (Wirkstoff 0.5%) behandelt, und danach wurde die behandelte Haut einer Mikroperfusionsuntersuchung unterzogen.

Nach dem Eintreffen im clinical research center (CRC) des ZMFs (7 Uhr) und nach der darauffolgenden Aufklärung und Untersuchung des Probanden, wurde eine venöse Kanüle gelegt. Über diese wurde eine venöse Blutprobe für Routineuntersuchungen entnommen und daraus das Eigenserum für das Perfusat gewonnen. Diese Kanüle verblieb aus Sicherheitsgründen während des gesamten Untersuchungstages im Arm. Es wurde in weiterer Folge kein Blut mehr entnommen.

Nach der Blutentnahme wurden 3 Stück Mikroperfusions-Hautkatheter (0,4 mm Durchmesser) sehr oberflächlich (in ca. 0,7 mm Tiefe) und im Abstand von je 10 mm parallel in läsionaler Haut und ebenfalls 3 Stück in nicht läsionaler Haut gelegt (Abb. 16 Nr.1). Diese Katheter wurden anschließend an einem Ende (Einlass) mit einer tragbaren Minipumpe verbunden und mit physiologischer Kochsalzlösung (Perfusat aus 4:1 ELO-MEL und Serum des Probanden) durchströmt. Am anderen Ende (Auslass) des Katheters wurde die durch den Katheter durchströmende Flüssigkeit (Perfusat) kontinuierlich gesammelt. Weiters wurden zwei Stellen je ca. 4 cm² in läsionaler und zwei in nicht läsionaler Haut ausgewählt und für die später durchgeführten Biopsien markiert (Abb. 16 Nr.2+Nr.3).

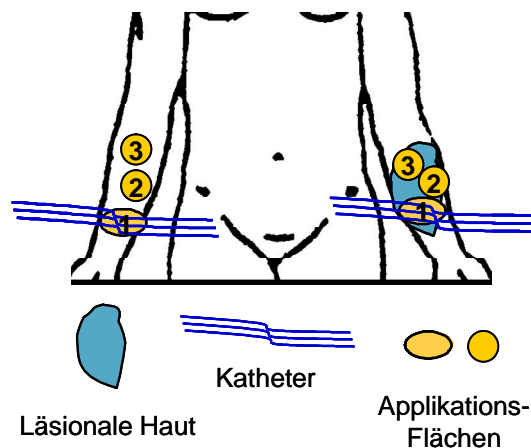


Abb. 16 Übersicht über die Applikationsstellen

Sobald das System um ca. 9:30 einsatzbereit war, wurde mit der Mikroperfusionsuntersuchung begonnen. In der ersten Stunde wurden die ISF gesammelt, um die Ausgangswerte (basale Konzentrationen) bestimmen zu können.

Um ca. 11 Uhr wurde der Wirkstoff auf die über den Kathetern liegenden Hautareale (Abb. 16 Nr.1), für die Biopsie Visite 1 (Abb. 16 Nr.2) und Biopsie Visite 2 (Abb. 16 Nr.3) reservierten Stellen appliziert. Dafür wurden Finn-chambers mit einem Durchmesser von 18 mm verwendet. Diese sollten das Risiko einer Kontamination der Katheter, verursacht durch verschleppte Creme, vermindern. Es wurde eine 10 mm Linie Creme auf die Finn-chambers aufgetragen (ca. 2,5 cm²), wonach letztere mit Klebestreifen am Probanden befestigt wurden. In den folgenden 24 Stunden wurde das Perfusat in stündlichen Abständen gesammelt, um später im Labor ausgewertet zu werden.

Um 12 Uhr wurden die Finn-chambers entfernt und überschüssige Creme mit Wattestäbchen vorsichtig abgewischt.

Um 15 Uhr (vier Stunden nach Applikation) wurde eine Biopsie aus läsionaler sowie aus nicht läsionaler Haut entnommen. Davor wurde das Stratum corneum durch sechsfaches „tape stripping“ mit Tesafilm® entfernt. Nach einer lokalen Anästhesie wurde das Biopsie Messer an der Hautoberfläche angesetzt und eine Probe mit einem Durchmesser von 3 mm herausgestanzt. Schließlich wurde der Hautzylinder vom darunterliegenden Gewebe mit einer Schere abgeschnitten.

Während der verbleibenden Dauer der Untersuchung wurde stündlich Probenflüssigkeit gesammelt, bis am Tag 2 um 11 Uhr die Mikroperfusions-Untersuchung beendet wurde. Dann wurde die Creme erneut auf die zu behandelnden Hautstellen aufgetragen und den Patienten dabei gezeigt, wie sie das zu Hause selbst tun müssen. (einmal täglich) Zu diesem Zeitpunkt beurteilte der Dermatologe erneut das Erscheinungsbild der behandelten Hautstellen, überprüfte die Lage der Hautkatheter mit einem Ultraschallgerät und entfernte dann alle Katheter aus der Haut.

Bevor der Patient um ca. 12 Uhr die Klinik verließ, wurde eine weitere Blutprobe für Routineparameter entnommen und die venöse Kanüle entfernt. Dabei wurde der Patient erneut untersucht (inkl. Blutdruck, EKG).

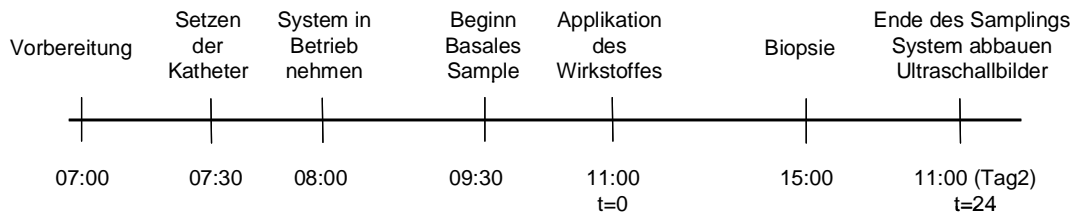


Abb. 17 Zeitlicher Ablauf eines Untersuchungstages

Weiterbehandlungsphase & Kontrollen

Am Folgetag (Tag 3) sowie am Tag 5 kamen die Patienten für ca. 30 min an die Klinik und trugen unter Aufsicht des Studienpersonals bzw. des Dermatologen die Creme selbst auf die Behandlungsstellen (Abb. 16 Nr.1+Nr.3) auf. Vor dem Auftragen beurteilte der Dermatologe die behandelten Hautstellen und untersuchte die Patienten (inkl. EKG). Am Tag 5 wurde zusätzlich auch eine Blutprobe entnommen.

Mikroperfusionsvisite 2 (Tag 8-9)

Eine Wiederholung des Protokolls von Visite1 (Tag 1-2), jedoch wird beim Nachhausegehen keine Creme mehr aufgetragen. Somit wurden die Hautstellen acht Mal behandelt.

Ende der Studie & Nachuntersuchungen (Tag 13)

Der Dermatologe beurteilte letztmalig die behandelten Hautstellen. Es wurde eine Blutprobe entnommen und die physiologischen Funktionen des Patienten (Blutdruck, Puls und EKG) kontrolliert.

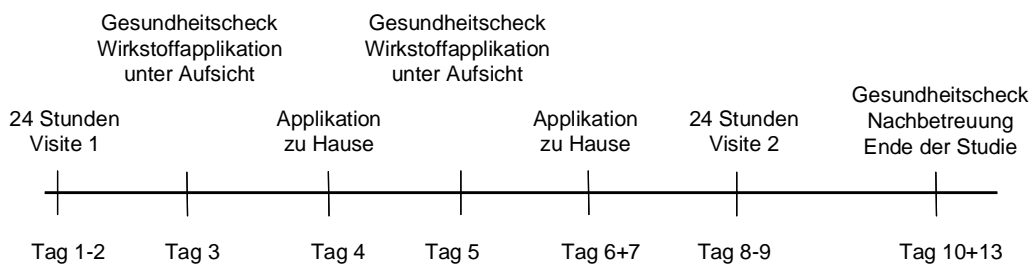


Abb. 18 Dauer und Ablauf der klinischen Studie in der Übersicht

2.3.3 Probenanalyse & Datenauswertung

Um die in 2.3 genannten Ziele beantworten zu können wurden folgende Messungen durchgeführt:

- Volumenbestimmung der stündlich gesammelten Probenflüssigkeit und daraus abgeleitet die erzielten Flussraten
- 24 Stundenverlauf der Wirkstoffkonzentration (Pharmakokinetik)
- 24 Stundenverlauf der TNF-alpha Konzentration (Pharmakodynamik)

Diese Daten wurden bei 9 Probanden akquiriert und lassen sich wiederum in vier Ergebnisgruppen einteilen:

<ul style="list-style-type: none">• Visite 1 läsional• Visite 1 nicht läsional	Messungen am Tag 1/2
<ul style="list-style-type: none">• Visite 2 läsional• Visite 2 nicht läsional	Messungen am Tag 8/9

Stündliches Sammeln von Probenflüssigkeit

Die Glaskapillaren wurden dem Samplingsystem beim stündlichen Wechsel entnommen, auf einer Transporteinheit abgelegt und zum Arbeitsplatz gebracht. Dort standen eine Feinwaage, die beschrifteten und abgewogenen Probenbehältnisse und ein schon zuvor kontrolliertes Protokoll mit den eingetragenen Leergewichten bereit. Die mit 15 µl gefüllten Glaskapillaren wurden mit einem Pipettierwerkzeug in die Probenbehältnisse entleert. Das Probenbehältnis wurde anschließend abgewogen und dessen Gewicht in das Protokoll eingetragen. Dann konnten die erhaltenen Daten in Excel dargestellt werden. Als Darstellungsform wurde ein Boxplot der Mediane der Konzentrationen gewählt.

Setztiefen der Katheter

Im Anschluss an das 24-Stunden-Sampling wurden Ultraschallbilder der sechs implantierten Katheter angefertigt. In diesen erschien der Katheter als kleiner weißer Punkt. Aus dem Abstand zwischen der Hautoberfläche und dem Punkt wurde die Setztiefe durch Abmessen bestimmt.

24-Stundenverlauf der Wirkstoffkonzentration (Pharmakokinetik)

Für die Erstellung des 24-Stundenverlaufes der Wirkstoffkonzentration wurden die Proben der Stunde 0 (basal), der Stunden 1-6, 12 und 24 im Labor analysiert und diese Daten ausgewertet.

24-Stundenverlauf der TNF-alpha Konzentration (Pharmakodynamik)

Um den 24-Stundenverlauf der TNF-alpha Konzentration in etwa zu erfassen, wurden die Proben der Stunden 0, 6, 12 und 24 analysiert. Auf die Analyse aller Proben bzw. Samplingintervalle (25 Intervalle zu je 60min) wurde auf Grund der hohen Analysekosten (ELISA-kits) verzichtet.

Wirkstoffkonzentration der Haut mittels Biopsie

Bei beiden Visiten wurden jeweils eine Biopsie in der läsionalen und eine in der nicht läsionalen Haut entnommen. Diese Proben wurden im Labor auf den Wirkstoff hin untersucht und seine Konzentration bestimmt. Die erhaltenen Konzentrationen der beiden Besuche und der beiden Hautstellen wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrang-Test statistisch ausgewertet.

Laboranalyse

Spezielle Herausforderungen an die Laboranalyse waren die hohe Lipophilie des Wirkstoffes, die sehr kleinen Konzentrationen und das sehr beschränkte Samplevolumen (max. 45 µl pro Stunde). Das für die Analyse notwendige Samplevolumen wurde durch „Poolen“ erreicht. Dabei wurden die drei tiefgekühlten Proben derselben Applikationsfläche und desselben Zeitpunkts wieder zusammengeführt.

Analysemethode zur Messung des Wirkstoffes

Die Quantifizierung des Wirkstoffes (in der ISF und in der Biopsie) wurde mit einer validierten cap-HPLC/MS/MS Methode gemäß „Bioanalytical Method Validation, May 2001“ (FDA Guidance for Industry) durchgeführt. Diese Methode vereint eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer Massenspektrometrie (MS). Dabei dienten der Chromatograph zur Auftrennung und das Massenspektrometer zur Quantifizierung des Wirkstoffes.

Analysemethode	Cap-HPLC/MS/MS
Analysegerät HPLC	Agilent Cap-HPLC
Analysegerät MS	ABI Qtrap 4000
Probenmenge	>30 µl
Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)	0,033 ng/ml Wirkstoffkonzentration
Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ)	33 ng/ml Wirkstoffkonzentration

Tabelle 3 Optimierte Methode für die Konzentrationsmessung des Wirkstoffes

Die Analytik wurde auf den Bereich zwischen LLOQ und ULOQ optimiert und validiert. Für die Biopsie musste die Methode für einen Bestimmungsbereich > 0,8 ng/ml angepasst werden.

Analysemethode zur Messung von TNF alpha

Die Quantifizierung von TNF-alpha in den Proben wurde mit einem hochsensitiven humanen TNF-alpha ELISA Quantikine HS Kit (R&D Systems) durchgeführt. Das ELISA wurde auf den Bereich zwischen LLOQ und ULOQ optimiert und für die Samplematrix validiert.

Analysemethode	Human TNF-alpha ELISA Quantikine HS kit(R&D Systems)
Probenmenge	>10 µl
Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)	9,7 pg/ml TNF alpha Konzentration
Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ)	155 pg/ml TNF alpha Konzentration

Tabelle 4 Optimierte Methode für die Konzentrationsmessung von TNF-alpha

Die Analyse von allen Proben wurde von der Forschungsgruppe „Bioanalytik und Metabolomics“ des HEALTHs in Graz, Stiftingtalstrasse 24, durchgeführt.

Auswertemethoden

Hier werden die verwendeten mathematischen und statistischen Werkzeuge angeführt und deren Zweck und Funktionsweise grob erläutert.

Median

Auf Grund der geringen Anzahl der Probanden und dem daher starken Einfluss der Ausreißer auf den Mittelwert wurde vom arithmetischen Mittelwert Abstand genommen. Als geeignetste Darstellungsform erwies sich der Median, auch „mittlerer“ Wert, Zentralwert oder 50%-Quantil genannt. Dieser ist bei einer geraden Anzahl an Daten der Mittelwert aus den beiden zentralen Werten.

Boxplot (Box-Whisker-Plot)

Um die Streuung der Daten grafisch darzustellen wurde der Boxplot gewählt. Die Berechnung und Erstellung des Diagramms wurde in Excel durchgeführt und mit Powerpoint überarbeitet.

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon signed-ranks test)

Der Wilcoxon-Vorzeichenrang-Test ist ein nicht parametrischer statistischer Test für die Häufigkeitsverteilung gepaarter Datenreihen. Seine Besonderheit liegt darin, dass nicht nur Vorzeichen und Rang berücksichtigt werden, sondern auch die Stärke der Differenzen zwischen den gepaarten Daten. Folgende Irrtumswahrscheinlichkeiten fanden besondere Berücksichtigung: $p < 0,05$ wurde als signifikant und $p < 0,01$ als hoch signifikant angenommen.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt.

Von der Verwendung des gepaarten student's t-tests wurde Abstand genommen, weil keine der zu testenden Datenreihen die erforderliche Stichprobengröße ($n = 30$) erreichte. Daher konnte nicht überprüft werden, ob eine Normalverteilung vorliegt.

Alle in dieser Arbeit vorkommenden Diagramme und Graphen wurden mit Excel erstellt. Anschließend wurde deren Layout in Powerpoint überarbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Anpassungen am dermalen Samplingsystem

3.1.1 In vitro Adsorptionstests

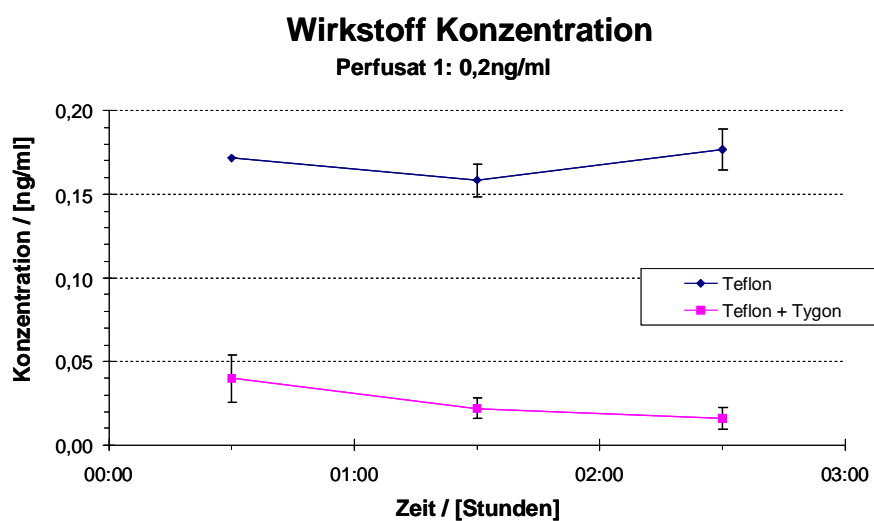


Abb. 19 Konzentrationsverlauf (Mittelwert \pm SD; n=2) in den verwendeten Systemen, Teflon und Teflon+Tygon, bei einer Perfusatkonzentration von 0,2 ng/ml.

Abb. 19 zeigt die Wirkstoffkonzentration von Testablauf 1 + 2 (aus 2.1.1) mit eingezeichneter Standardabweichung. Die gemessene Konzentration der Probenflüssigkeit von System A (Teflon) schwankt im Bereich von 0,15 ng/ml bis 0,18 ng/ml. Die Konzentration der Proben von System B (Teflon + Tygon) sinkt während den 3 Stunden von 0,05 ng/ml auf 0,02 ng/ml. Eine Kontrollmessung des bereitgestellten Perfusates ergab, dass die tatsächliche Konzentration in Perfusat 1 bei 0,18 ng/ml lag. Dieser Wert wurde als Ausgangsbasis bei der Berechnung der Adsorption genommen. Die Adsorption wurde definiert als Quotient zwischen der Konzentration in der Probe und der Konzentration im Perfusat.

Adsorption am Schlauch-Material

Perfusat 1: 0,2ng/ml

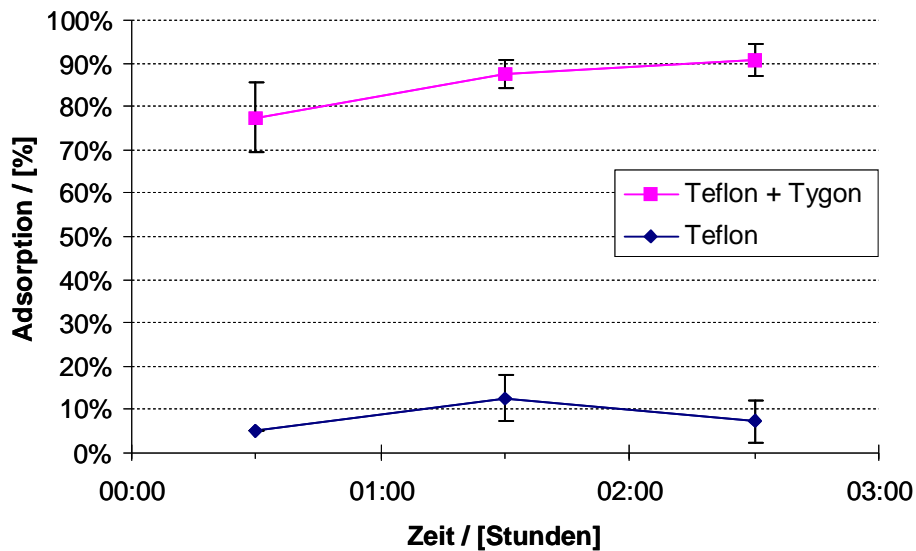


Abb. 20 Adsorptionsrate (Mittelwert \pm SD; n=2) in den verwendeten Systemen, Teflon und Teflon+Tygon, bei einer Perfusat-Konzentration von 0,2 ng/ml.

Abb. 20 stellt die Adsorption in Prozent mit eingezeichneter Standardabweichung dar. Die Adsorption des Systems A (Teflon) beträgt zwischen 3 % und 18 %. Die Adsorption des Systems B (Teflon + Tygon) steigt in den 3 Stunden von über 70% bis auf 93%.

Wirkstoff Konzentration

Perfusat 2: 1ng/ml

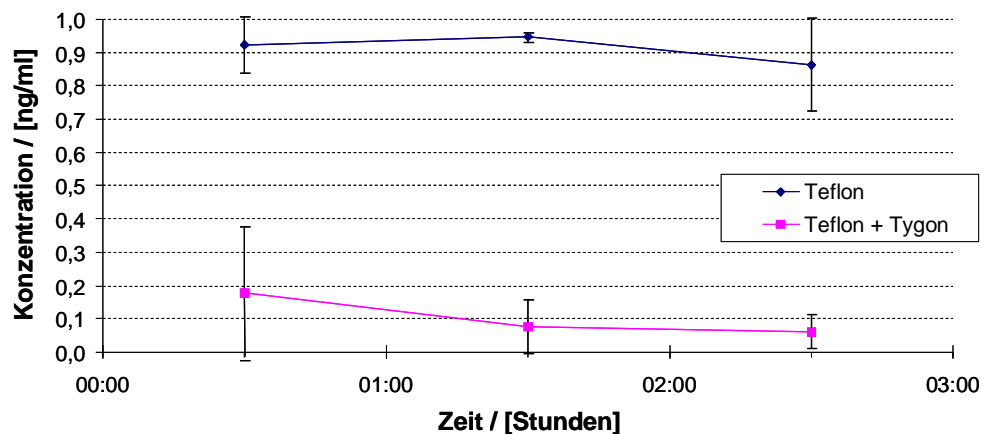


Abb. 21 Konzentrationsverlauf (Mittelwert \pm SD; n=2) in den verwendeten Systemen, Teflon und Teflon+Tygon, bei einer Perfusatkonzentration von 1 ng/ml.

Abb. 21 zeigt die Wirkstoffkonzentration von Testablauf 3 + 4 mit eingezeichneter Standardabweichung. Die Konzentration von System A (Teflon) liegt um 0,9 ng/ml. Die Konzentration von System B (Teflon + Tygon) fällt in den 3 Stunden von 0,39 ng/ml auf unter 0,11 ng/ml. Eine Kontrollmessung des Labors ergab, dass die tatsächliche Konzentration von Perfusat 2 bei 0,95 ng/ml lag. Diese wurde bei der Darstellung der Adsorptionsrate als Ausgangsbasis genommen.

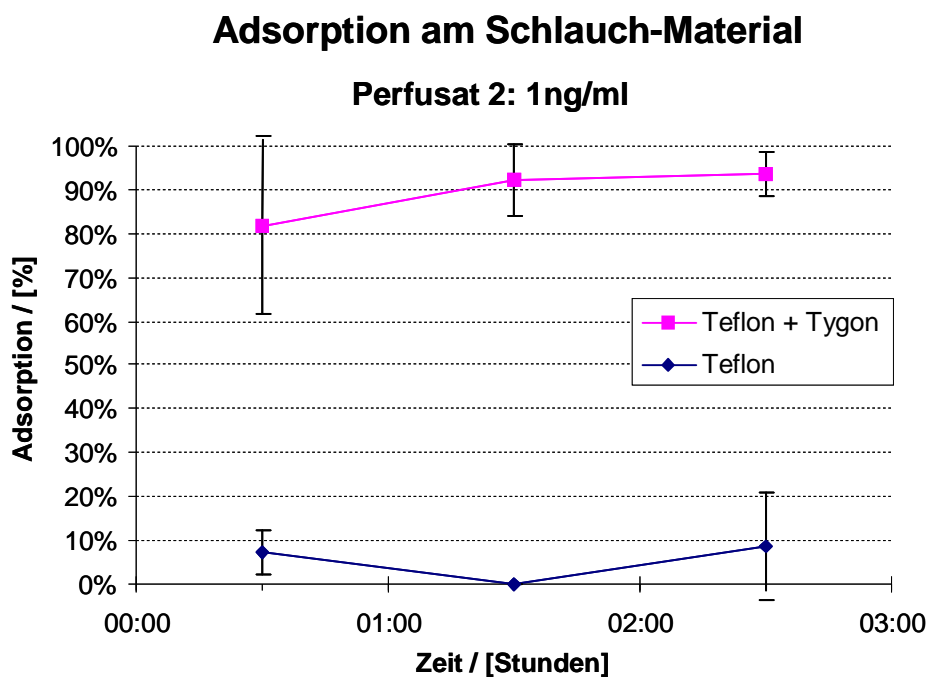


Abb. 22 Adsorptionsrate (Mittelwert \pm SD; n=2) in den verwendeten Systemen, Teflon und Teflon+Tygon, bei einer Perfusatkonzentration von 1 ng/ml.

Abb. 22 stellt die Adsorption in Prozent mit eingezeichneter Standardabweichung dar. Die Adsorption des Systems A (Teflon) liegt während der 3 Stunden unter 20%. In Stunde 2 betrug sie sogar 0% (Messwerte lagen mit 0,955 ng/ml und 0,956 ng/ml knapp über der gemessenen Perfusatkonzentration von 0,954 ng/ml). Die Adsorption des Systems B (Teflon + Tygon) steigt von anfänglich über 60% bis auf 89%.

Kommt es zu einem Konzentrationsverlust im Probenbehälter?

Es wurden Probenbehälter mit Konzentrationen von 1ng/ml und 100ng/ml gefüllt und über eine Testdauer von 4 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden sie 12 Stunden bei +4 °C gekühlt, 2 Tage bei -20 °C und 7 Wochen bei -80 °C gelagert. Es konnte kein signifikanter Konzentrationsverlust im Probenbehälter festgestellt werden. Auch nach drei Frier-Tau-Zyklen blieben die Konzentrationen stabil.

Die Analysen im Labor ergaben außerdem, dass die zu erwartenden Wirkstoffkonzentrationen im klinischen Versuch signifikant kleiner als 30 ng/ml sein werden. Somit konnte die Laboranalyse für die weiteren Untersuchungen auf einen Messbereich zwischen LLOQ 0,033 ng/ml und ULOQ 33 ng/ml optimiert werden.

3.1.2 In vivo Flussratentest

Der in vivo Flussratentest wurde mit einem Samplingsystem ohne Pull-Zweig durchgeführt. Dieses sogenannte „Schwerkraft“-Samplingsystem zeigt Abb. 23.



Abb. 23 Versuchsaufbau „Schwerkraft“-Samplingsystem zur Durchführung des in vivo Flussratentests

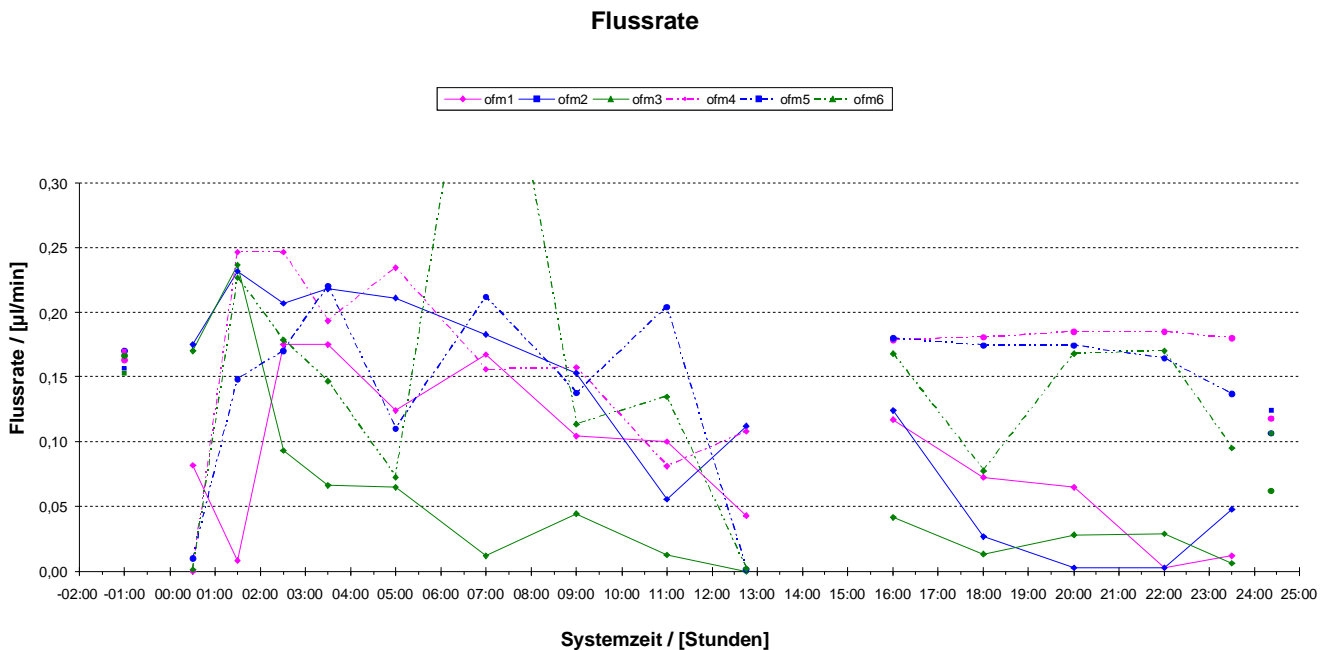


Abb. 24 Verlauf der Flussraten der sechs Mikroperfusionskatheter

Zur Stunde 0 „basales Sample“ wurde eine Flussrate zwischen 0,16 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,17 $\mu\text{l}/\text{min}$ erzielt. Die basalen Messpunkte sind als Einzelwerte am linken Rand des Diagramms eingezeichnet (siehe Abb. 24 Systemzeit -01:00).

Der Katheter „OFM1“ verstopfte in Stunde 1, wurde gespült und lief dann bis zur Stunde 12 mit einer Flussrate zwischen 0,06 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,17 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der Katheter „OFM2“ lief bis zur Stunde 12 mit einer Flussrate zwischen 0,15 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,23 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der Katheter „OFM3“ verstopfte in Stunde 7 und wurde dann gespült. Bis zur Stunde 7 lief er mit einer Flussrate zwischen 0,06 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,24 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der Katheter „OFM4“ lief bis zur Stunde 12 mit einer Flussrate zwischen 0,08 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,23 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der Katheter „OFM5“ lief bis zur Stunde 12 mit einer Flussrate zwischen 0,11 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,22 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der Katheter „OFM6“ verstopfte in Stunde 5, wurde dann gespült. Nach dem Spülen wurde vergessen die Klemme der Gilson-Pumpe zu schließen. Das erklärt den Ausreißer zur Stunde 7. Danach lief „OFM6“ bis zur Stunde 12. Seine Flussrate bewegte sich zwischen 0,11 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,23 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Während Stunde 13 kam es bei allen Kathetern zu einem Stopp des Durchflusses, der auch durch Spülen nicht mehr gelöst werden konnte. Um einen Abbruch des in vivo Versuches zu verhindern, wurde entschieden das System in Push-Pull-Modus weiterzubetreiben. An die offenen Katheterenden, die in den Probenbehältern hingen (siehe Abb. 23), wurden Pumpschläuche montiert und in den Gilson-Pumpen fixiert. Um drei Push- und drei Pull-Schläuche in einer 4-Kanal-Pumpe betreiben zu können, wurden zwei Mal zwei Katheter in einem Kanal zusammengefasst.

Anschließend konnte das Sampling im Push-Pull-Betrieb fortgesetzt werden. Die Flussraten zu Beginn des Push-Pull-Betriebes sind als Einzelwerte am rechten Rand des Diagramms eingezeichnet (siehe Abb. 24 Systemzeit 24:30)

Der Katheter „OFM1“ lief mit einer Flussrate zwischen 0,06 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,12 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis er gegen Ende der Studie verstopfte. Der Katheter „OFM2“ lief mit einer Flussrate zwischen 0,03 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,12 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis er nach der zweiten Messung durch Blutgerinnung verstopfte. Der Katheter „OFM3“ lief mit einer Flussrate zwischen 0,04 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,01 $\mu\text{l}/\text{min}$ weil der Katheter am Eintritt oder Austritt Luft ansaugte. Dies unterbrach den Fluss. Der Katheter „OFM4“ lief mit einer Flussrate zwischen 0,18 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,19 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis zum Ende der Studie. Der Katheter „OFM5“ lief mit einer Flussrate zwischen 0,14 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,18 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis zum Ende der Studie. Der Katheter „OFM6“ lief mit einer Flussrate zwischen 0,08 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,17 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis zum Ende der Studie.

24 Stunden Sampling ist ohne Pull-Zweig nicht durchführbar. Nach 12 Stunden fielen alle Katheter aus. Auch ein „Durchspülen“ der Katheter half nicht, um den Betrieb des Systems wieder aufnehmen zu können. Der Proband könnte ebenfalls als mögliche Fehlerquelle in Betracht genommen werden, da die Probenbehälter nur 4 cm von den Kathetern entfernt standen. Während des Schwerkraft-Samplings konnte der Proband seine Liegeposition kaum verändern und musste seinen Unterarm 24 Stunden lang ruhig liegen lassen. Das erwies sich als möglich, aber während der Nachtstunden kaum durchführbar. Außerdem ist es mit überaus großen persönlichen Einschränkungen verbunden.

Ein Perfusatverlust in der Dermis bzw. an die Dermis wurde nicht festgestellt.

3.1.3 In vivo Vorversuch mit neuer Minipumpe

Ziel dieses Vorversuches war es, das „Tragbare Samplingsystem“ einem 24 Stunden Praxistest zu unterziehen, um mögliche Fehlerquellen und Probleme zu orten. Weiters wurden die gesammelten Proben im Labor auf TNF-alpha untersucht.

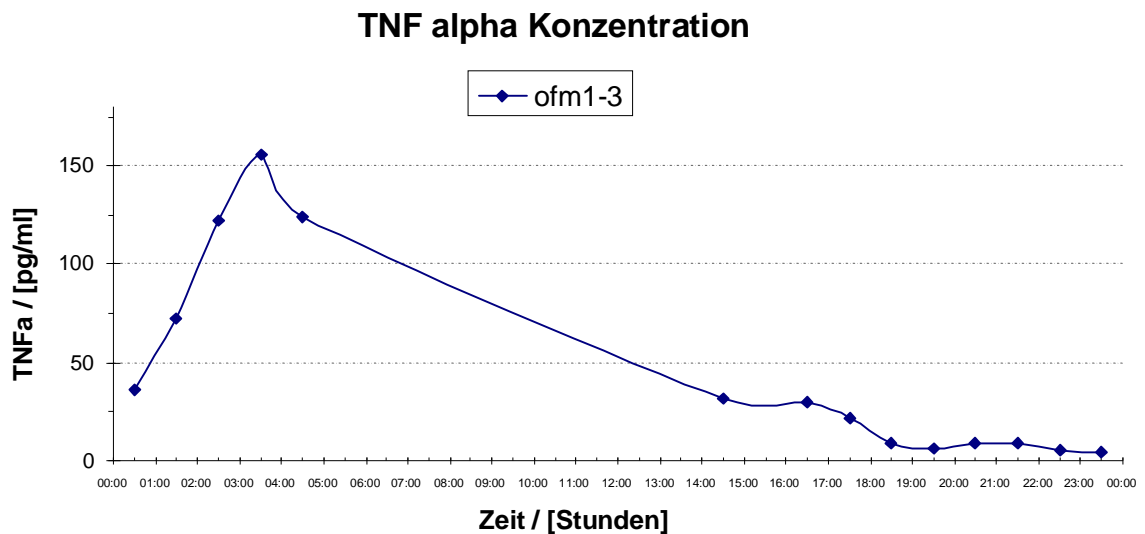


Abb. 25 TNF alpha Konzentrationsverlauf

Die Konzentration stieg in den ersten vier Stunden bis zur ULOQ (oberen Nachweisbarkeitsgrenze des ELISA-kits) an. Diese für die OFM ungewöhnlich hohe TNF-alpha-Konzentration wurde durch ständiges leichtes Bewegen der Katheter und die dadurch hervorgerufenen Hautreizungen provoziert.

Aufgetretene Probleme beim in vivo Test des Systems

Auf der nächsten Seite befindet sich Tabelle 5. Sie zeigt beobachtete bzw. aufgetretene Probleme während der Vorversuche und dafür gefundene Lösungen, die bei der klinische Studie (2.3) angewendet wurden.

Problem	Betroffene Komponente	Gefundene Lösung
Ansaugen von Luft in den Katheter / Austritt von Probenflüssigkeit	Austauschfläche des Katheters	Verlängerung der Implantationsstrecke gegenüber der Austauschfläche
Okklusion des Katheters während Implantation	Katheter	Metalldraht im Katheter
Überdehnen des Katheters	Katheter	Metalldraht im Katheter
Verrutschen des Katheters	Katheter / Stoppring / Silikondichtung	Geeignetes Werkzeug bereitgestellt / Stoppringe verbessert
Gefährdung des Patienten bei Entfernung des Drahtes und der Implantationsnadel	Katheter / Implantationsnadel	Abgerundete Schere bereitgestellt
Verletzen des Katheters	Silikondichtung / Proben-Sammel-System	Geeignete Pinzette mit Klebeband bereitgestellt
Einlegen der Dichtung in das Proben-Sammel-System	Silikondichtung / Proben-Sammel-System	Grate und Kanten im Proben-Sammel-System rundgefeilt / Schlitz ins Proben-Sammel-System gefräst
Wechsel der Glaskapillare	Glaskapillare / Proben-Sammel-System	Pinzette mit Klebeband umwickelt / Auflagesteg im Proben-Sammel-System für die Glaskapillare
Verwechslung von Perfusatbeutel und Proben zwischen den Probanden (bei gleichzeitiger Studie mit mehreren Probanden)	Perfusatbeutel / Arbeitsplatz / Glaskapillare / Probenbehältnis	Farbliche Kodierung der Werkzeuge und Arbeitsutensilien / räumliche Trennung
Verwechslung der Glaskapillaren beim Probenwechsel	Glaskapillaren / Probenbehälter	Geeignetes Transportmittel bereitgestellt
Festmachen des Systems (insbesondere der Pumpe) am Körper (Klettverschlussgurte erwiesen sich als ungeeignet)	Pumpe / Proben-Sammel-System / Schläuche / Katheter	Klebestreifen / Klebe-OP-Tuch / beidseitig klebende atmungsaktive Folie (Opsite)
Verletzen des Katheters oder Pumpschlauches durch das Verbindungsrohrchen	Katheter / Pumpschlauch / Verbindungsrohrchen	Verlängern des Katheters und mit Klebeband am Körper fixieren / Abstumpfen des Verbindungsrohrchen
Luft und Unterdruck im Perfusatbeutel	Perfusatbeutel	Luft weitest möglich entfernt / Perfusatbeutel mit Klammer versehen
Sterilität des Katheters während Implantation	Verpackung des Katheters	Katheter doppelt verpackt zur Sterilisation gebracht
Verrutschen der Pumpschläuche in der Pumpe	Pumpe / Pumpschläuche mit Spannstege	Plastikfolie zwischen Pumpschlauch und Pumpe
Überdehnung und Reißen des Pumpschlauches	Pumpe / Pumpkopf / Pumpschlauch	Schutzfolie zwischen Pumpkopf und Pumpschläuche

Tabelle 5 Beobachtete Probleme während den Vorversuchen

3.2 Das dermale Samplingsystem

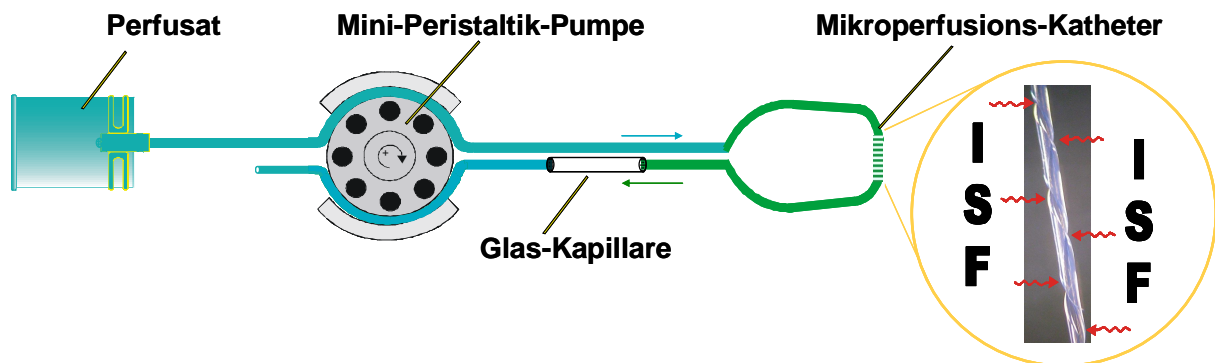


Abb. 26 Übersichtsschema des dermalen Samplingsystems mit Benennung der einzelnen Komponenten

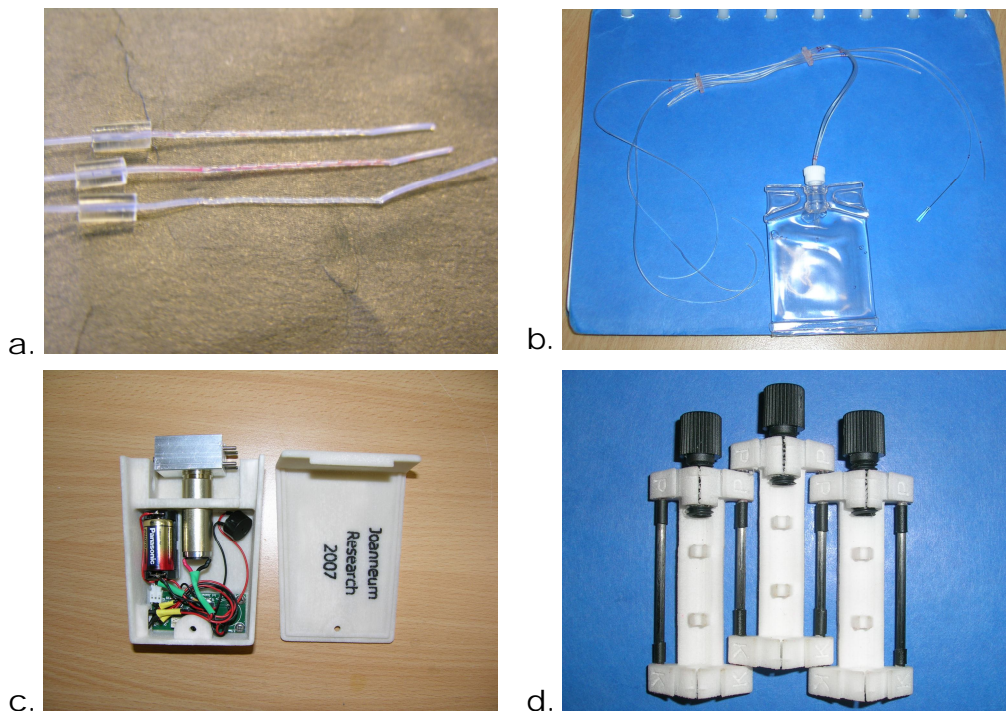


Abb. 27 Fotos der vier Komponenten: a.: Dermale Mikroperfusions-Katheter
 b.: Pumpschläuche mit Perfusatebeutel c.: Mini-Peristaltikpumpe
 d.: Proben-Sammel-System

Abb. 27a zeigt drei verwendete Mikroperfusionskatheter nach der Explantation. In Abb. 26 sind die Katheterschläuche grün eingezeichnet. Die Pumpschläuche und der Perfusatebeutel (Abb. 27b) sind im Schema blau. Die Schläuche an der rechten Seite der Abb. 27b führen von der Glaskapillare zurück zur Pumpe. Die

längeren Schläuche an der linken Seite führen vom Perfusat zum Katheter. Die beiden Plastikhalterungen, in denen die Pumpschläuche festgeklebt wurden, werden im Pumpkopf der Mini-Peristaltikpumpe (Abb. 27c) eingespannt. Abb. 27d zeigt das Proben-Sammel-System in dem die Glaskapillare zwischen den beiden Silikondichtungen eingespannt liegt. Beim Probenwechsel wird die Schraube gelöst und die mit ISF gefüllte Glaskapillare zur weiteren Analyse entfernt. Anschließend kann eine leere Kapillare auf den Steg im Proben-Sammel-System gelegt werden und durch Dicht-Drehen der Schraube das Sampling fortgesetzt werden.

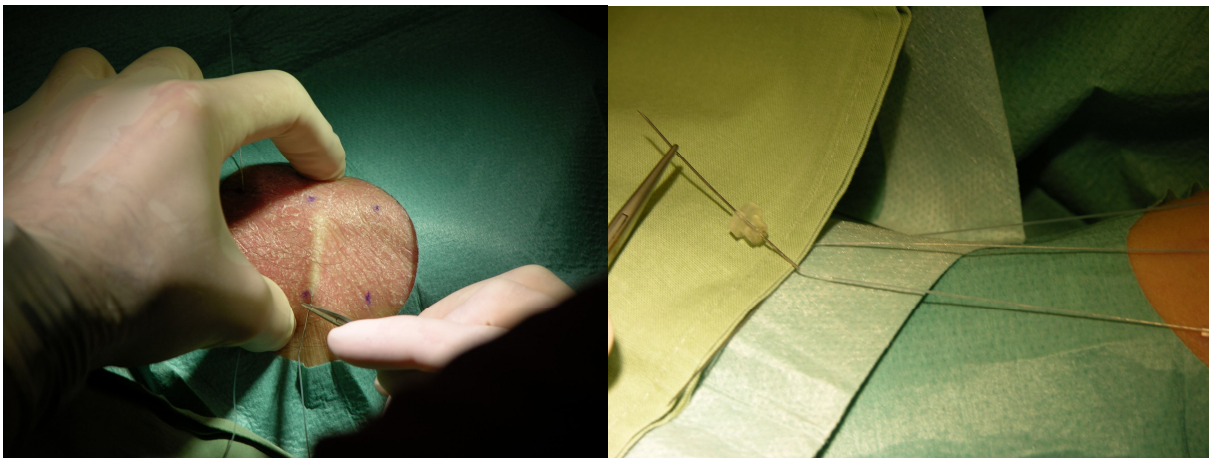


Abb. 28 Das linke Bild zeigt das oberflächliche Setzen des Mikroperfusions-Katheters in die Haut. Rechts wird nach dem Setzen die Silikondichtung über die Setznadel und über den Katheter-Schlauch geschoben. Im Katheter sieht man den dünnen Implantationsdraht.

Nach dem Markieren der Implantationsstellen wird die umliegende Haut mit einer Abdeckfolie zugeklebt und der Dermatologe kann mit dem Setzen des Katheters beginnen (siehe Abb. 28). Nachdem die drei Katheter eines Systems gesetzt worden waren, wurden diese mit Stoppringen in der Haut fixiert und Silikondichtungen bis zum Katheterende aufgeschoben. Die Setznadel und der überschüssige Katheterschlauch wurden weggeschnitten. Dabei wurde auch der Implantationsdraht aus dem Katheter gezogen.

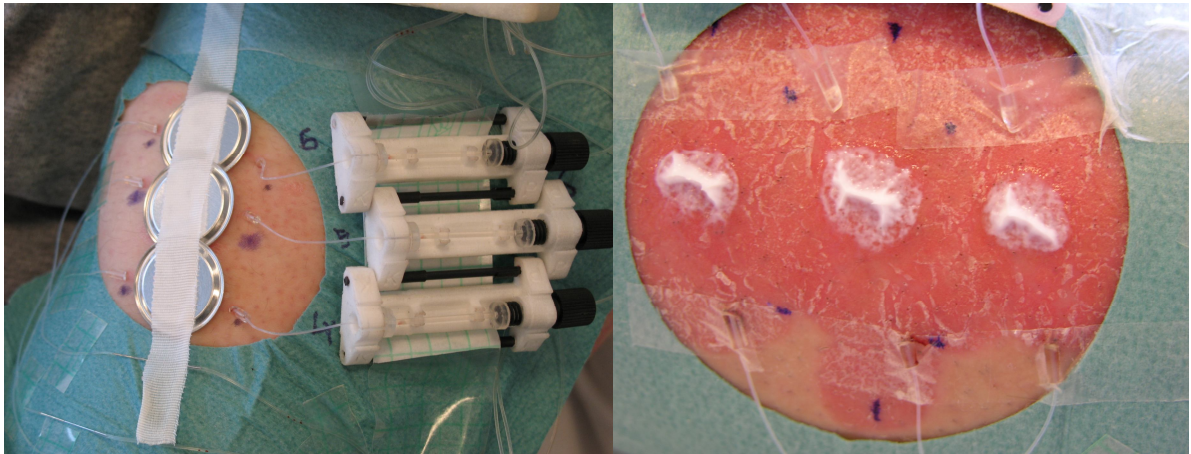


Abb. 29 Der Wirkstoff wurde in die Finn-Chambers aufgetragen und über den Kathetern fixiert (siehe links). Nach einer Stunde wurden die Finn-Chambers entfernt (siehe rechts) und die überschüssige Salbe mit Wattestäbchen sorgfältig abgewischt.

Die beiden Bilder (Abb. 29) zeigen das Kathetergebiet während der Applikation des Wirkstoffes. Die Ein- und Austrittslöcher unter den Stoppringen wurden mit Opsite® Klebefolie abgeklebt, um ein Eindringen der Salbe durch die Löcher zu vermeiden.

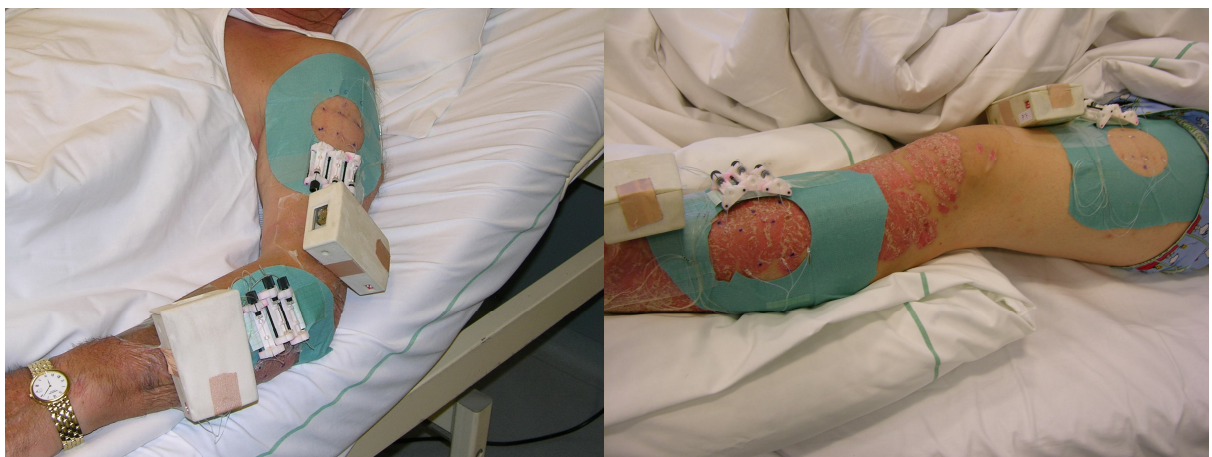


Abb. 30 Diese Fotos zeigen Samplingsysteme montiert an Ober- und Unterarm bzw. Ober- und Unterschenkel.

Diese beiden Fotos (Abb. 30) geben eine gute Übersicht über das System und dessen Applikation während des kontinuierlichen 24 Stunden Samplings. Es zeigt sich, dass das lokal befestigte System dem Patienten viel Bewegungsfreiheit gewährt.

3.3 Klinische Studie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der in vivo Untersuchungen präsentiert. Diese wurden sowohl in läsionaler als auch nicht läsionaler Haut ermittelt. Weiters wiederholten sich die Messungen eine Woche später. Somit lassen sich die Ergebnisse in vier Gruppen einteilen:

<ul style="list-style-type: none"> • Visite 1 läsional • Visite 1 nicht läsional 	Messungen am Tag 1/2
<ul style="list-style-type: none"> • Visite 2 läsional • Visite 2 nicht läsional 	Messungen am Tag 8/9

Tabelle 6 Gliederung der Ergebnisse

3.3.1 Gesammelte Volumina und erzielte Flussraten

Die gesammelten Mengen und erzielten Flussraten dienen als Gradmesser zur Beurteilung der Wirksamkeit des Systems. Abb. 31 zeigt die mittlere, stündlich gesammelte Menge und die mittlere erzielte Flussrate aller Systeme.

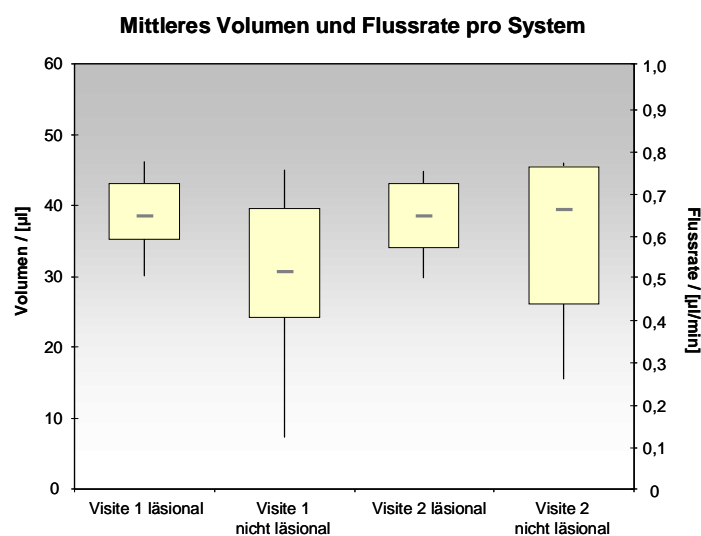


Abb. 31 Darstellung der gesammelten Mengen und erzielten Flussraten aller Systeme in einem Boxplot

Mittlere Flussrate pro System

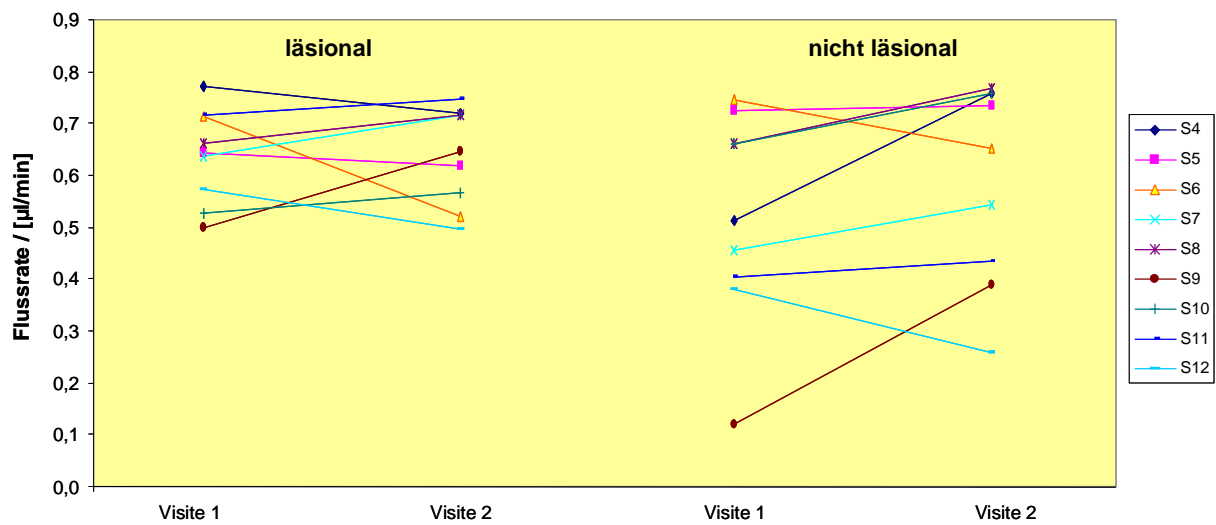


Abb. 32 Veränderung der Flussrate in Visite1 gegenüber Visite 2

In Abb. 32 wurde die Veränderung der erzielten Flussraten pro System angeschaut. Der Unterschied zwischen den beiden Visiten ist nicht signifikant.

Mittleres Volumen pro Katheter

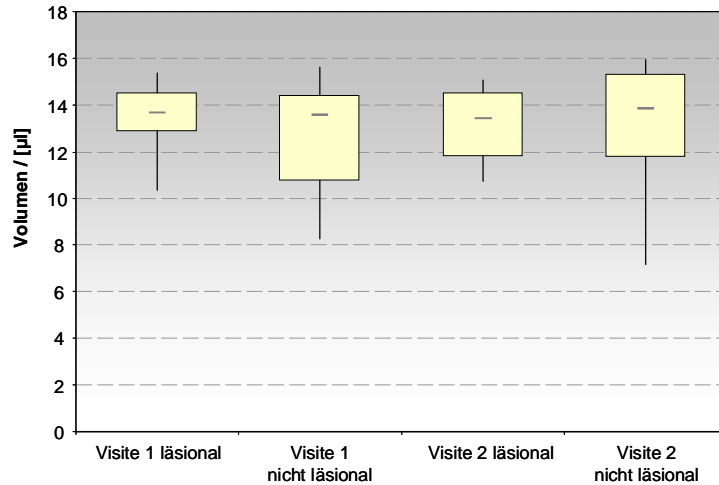


Abb. 33 Darstellung der mittleren gesammelten Menge pro Katheter

Abb. 33 soll die gesammelten Mengen funktionierender Katheter darstellen. Samplevolumina von „0“ wurden beim Erstellen dieses Boxplots ausgeschlossen.

3.3.2 Setztiefen

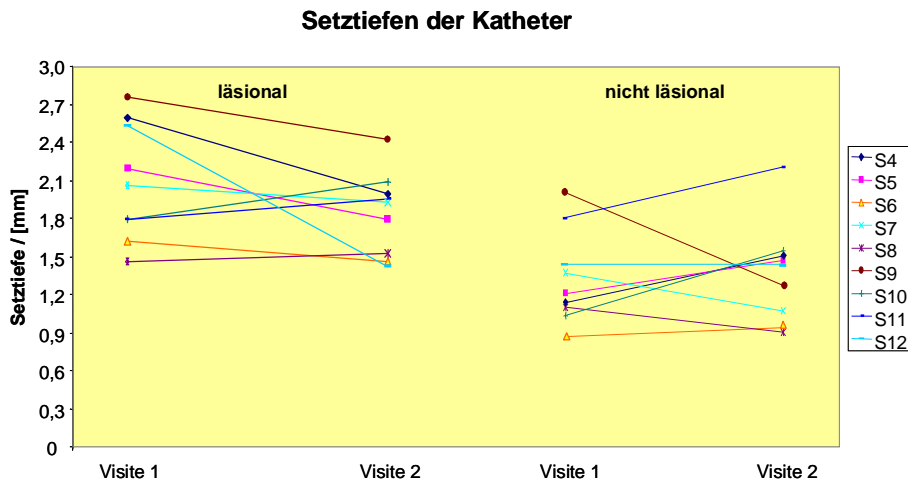


Abb. 34 Lage der Katheter in der Haut

Die Lage der Katheter wurde an Hand von Ultraschallbildern gemessen. In lésionaler Haut befanden sich die Katheter zwischen 2,7 und 1,4 Millimeter Tiefe, in nicht lésionaler Haut zwischen 2,2 und 0,9 Millimeter.

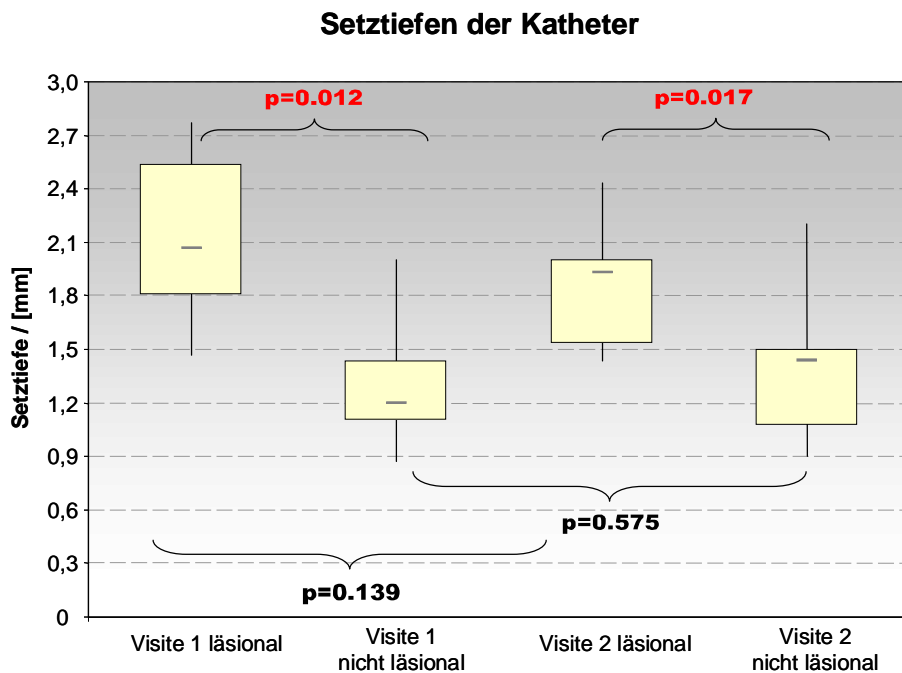


Abb. 35 Boxplotdarstellung der Setztiefen mit eingezeichneten p

Die vier Boxplots in Abb. 35 zeigen die Tiefen in denen sich die Katheter befanden. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test zeigt einen signifikanten Unterschied der Setztiefen zwischen lésionaler und nicht lésionaler Haut ($p = 0,012$ bzw. $p = 0,017$).

3.3.3 Wirkstoffkonzentration

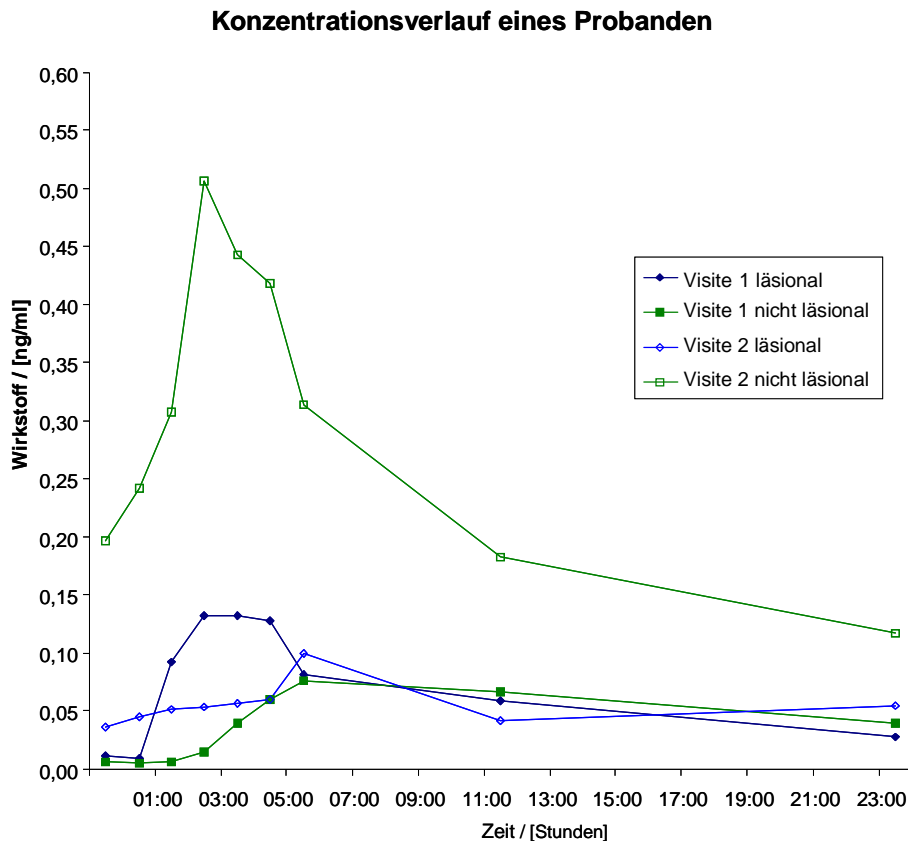


Abb. 36 Konzentrationsverlauf eines Probanden: Erster Wert des 9-Punkte-Profiles zeigt die basale Ausgangskonzentration. Anschließend die 24-Stunden Konzentrationsverlauf mit verbundenen Linien

Abb. 36 zeigt die Wirkstoffkonzentration eines Probanden (S08) über der Zeit. Die vier unterschiedlichen Gruppen werden als 9-Punkte-Profil mit verbundenen Linien dargestellt. Der erste Datenpunkt repräsentiert den basalen Wert (Stunde 0). Der Zweite zeigt die Konzentration in der ersten Stunde nach der Applikation, der Dritte in der zweiten Stunde usw. Die Kurven zeigen den zu erwartenden Anstieg nach der Applikation des Wirkstoffes und ein Abklingen gegen Ende des Versuches hin.

Aus den stündlichen (Stunde 0-6, 12, 24) Wirkstoffkonzentrationen wurden die jeweiligen Mediane über die Konzentration bestimmt. Diese wurden in ein 24 Stunden-Profil eingezeichnet und mit geraden Linien verbunden, um die Lesbarkeit zu verbessern.

24-Stundenprofil der mittleren Konzentration

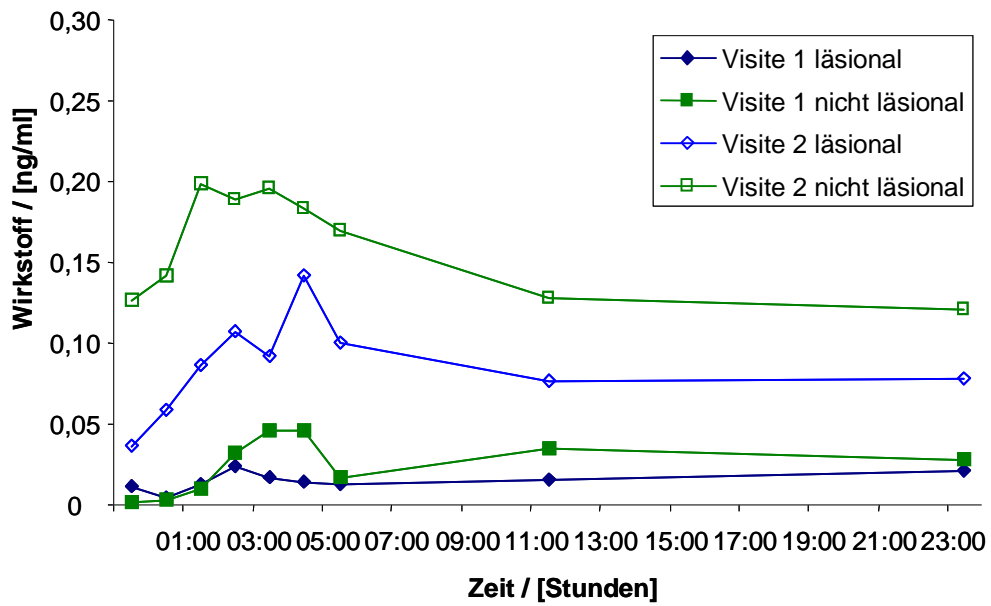


Abb. 37 Mittlere Wirkstoff Konzentration als 24-Stundenprofil

In Abb. 37 wurde aus der mittleren Konzentration der jeweiligen Stunden ein Profil über 24 Stunden eingezeichnet. Auch hier ist ein Anstieg der Konzentration nach der einstündigen Applikation zu verzeichnen und ein Abklingen gegen Ende der Dauer zu sehen.

Mittlere 24-Stunden-Konzentration pro Subject

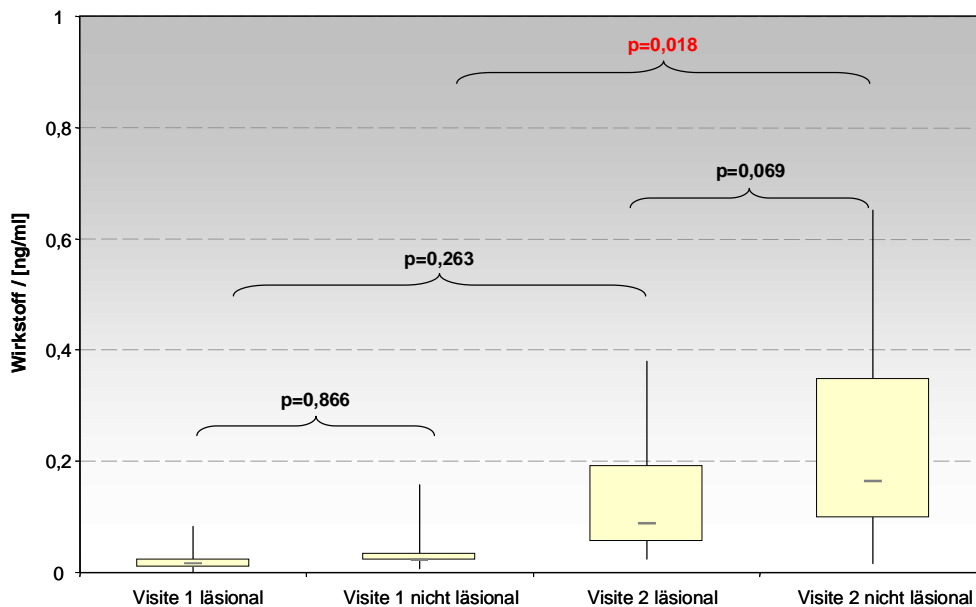


Abb. 38 Mittlere 24-Stunden-Konzentration – Vergleich der vier Gruppen

Um die Unterschiede in den vier Gruppen herauszuheben wurde der Median der Wirkstoffkonzentration eines Probanden bestimmt. Dieser stellt die mittlere Wirkstoffkonzentration über die 24 Stunden dar. Aus den Medianen jeder Gruppe wurde ein Boxplot erstellt und in Abb. 38 gegenübergestellt. Die statistischen Vergleiche innerhalb der vier Gruppen von Medianen wurden mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt. Die erhaltenen Irrtumswahrscheinlichkeiten p wurden in das Boxplot-Diagramm eingetragen. Die Konzentration in der nicht läSIONalen Haut ist in Visite 2 signifikant größer gegenüber der Konzentration einer Woche zuvor. Auch in der läSIONalen Haut war die mittlere Wirkstoffkonzentration bei der Visite 2 deutlich erhöht. Jedoch ist die statistische Auswertung der läSIONalen Konzentration mit einer größeren Unsicherheit verbunden, da Daten aufgrund von Ausreißern ausgeschlossen werden mussten und die Fallzahl (n) bei den Vergleichen daher reduziert war. Das Ergebnis der Signifikanzprüfung hing daher stark von der Entscheidung über den Datenausschluss ab.

3.3.4 TNF alpha

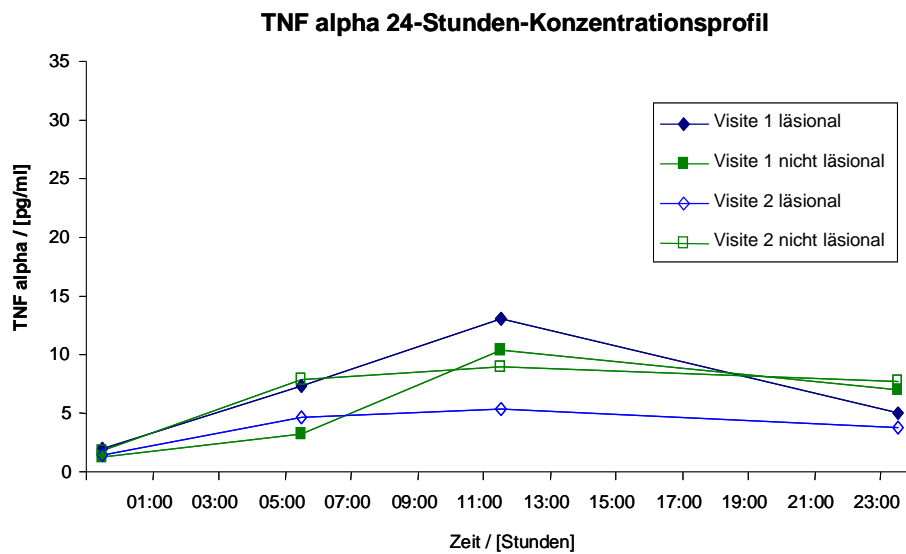


Abb. 39 TNF Alpha Konzentrationsmessergebnisse als 4-Punkte Profil über 24 Stunden

Das Konzentrationsprofil von TNF alpha wurde aus vier Messungen erstellt (basaler Wert, 6., 12., 24. Stunde). Die Konzentration stieg bis zur 12. Stunde und nahm danach ab.

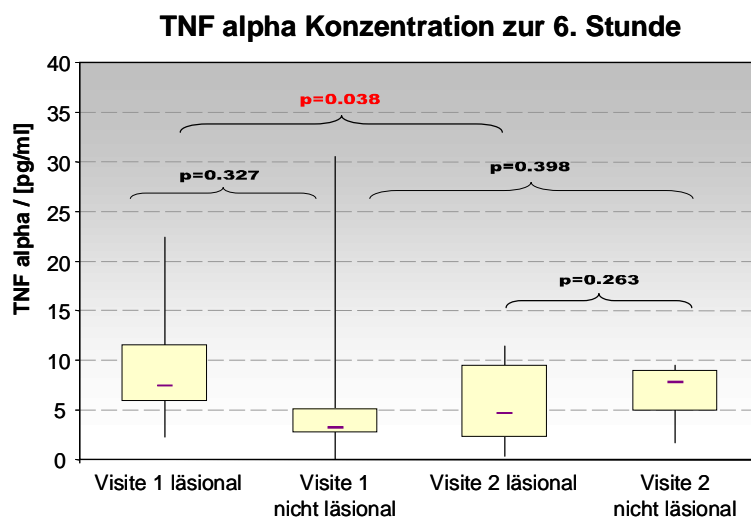


Abb. 40 TNF alpha Konzentration zur 6. Stunde als Boxplot dargestellt

Die in der sechsten Stunde gemessenen TNF-alpha Konzentrationen wurden statistisch ausgewertet. Es konnte eine Veränderung in läsionaler Haut festgestellt werden ($p = 0,038$).

3.3.5 Biopsie

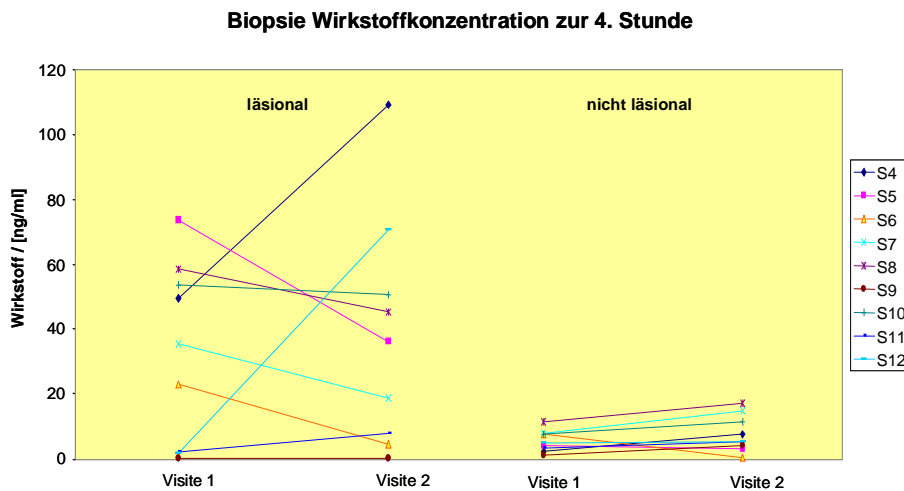


Abb. 41 Individueller Vergleich der Wirkstoffkonzentration aus den Biopsien zwischen Visite 1 und Visite 2

Die in der Hautbiopsie gefundene Wirkstoffkonzentration ist in Abb. 41 dargestellt. Sie zeigt die Konzentration des Wirkstoffes und dessen Veränderung von Visite 1 zu Visite 2.

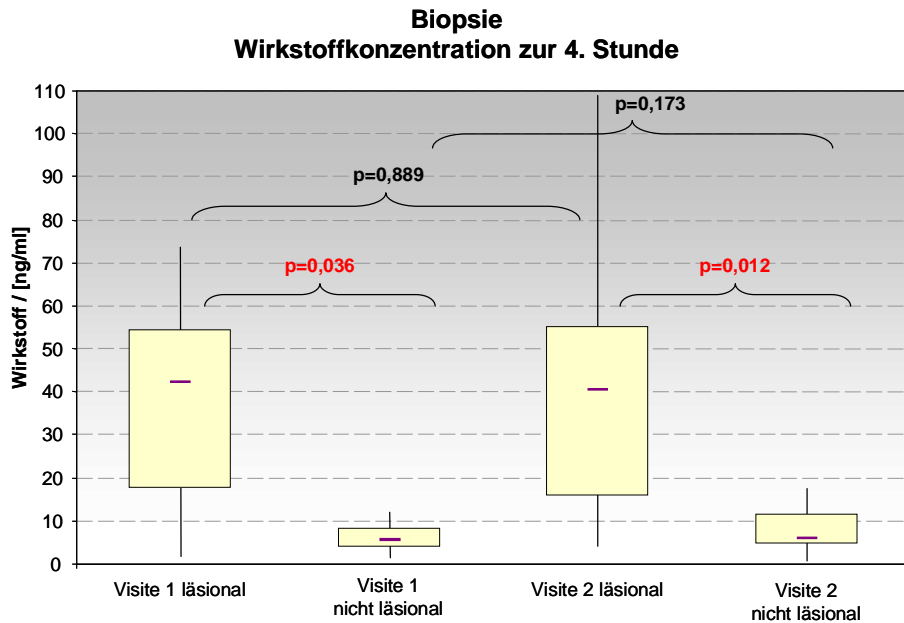


Abb. 42 Boxplotdarstellung der Wirkstoffkonzentration aus der Biopsie

Die Boxplots der Abb. 42 zeigen die Wirkstoffkonzentration des jeweiligen Hauttyps und Visite. Der durchgeführte Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der läsionalen und der nicht läsionalen Haut. Eine Veränderung von Visite 1 zu Visite 2 wurde aber nicht gefunden.

4 Diskussion

4.1 Das dermale Samplingsystem

Das dermale Samplingsystem wurde für die Anwendung am Menschen weiterentwickelt. Die im Vorfeld dieser Studie entwickelte Mini-Peristaltikpumpe machte die Optimierung hin zu einem tragbaren System erst möglich. So konnten sowohl die Länge als auch der Durchmesser der Pump- und der Katheterschläuche gegenüber dem in früheren Versuchen verwendetem Laborsystem mit stationärer Peristaltikpumpe entscheidend verkleinert werden. Die dadurch verkürzten Transportwege ermöglichten gemeinsam mit dem kurz nach Katheteraustritt montierten Proben-Sammel-System das adsorptionsfreie bzw. adsorptionsarme Sammeln mit kleinsten Flussraten. Dieses System sollte auch über 24 Stunden stabil und kontinuierlich Probenflüssigkeit sammeln können. Dieses Ziel wurde erreicht. In der klinischen Studie 2.3 wurde das dermale Samplingsystem zum ersten Mal in der Praxis an Patienten angewandt. Die Zielsubstanz konnte in der Probenflüssigkeit gemessen werden. Um in Zukunft das System effektiver einsetzen zu können, sollen hier Verbesserungsvorschläge diskutiert werden.

Produktion und Stabilität des PTFE-OFM-Katheters: Der verwendete OFM-Katheter aus Teflon zeigte in der Praxis einige Schwächen, die durch die lange Anwendungsdauer offengelegt wurden. Es traten bei einigen Systemen Flussratenschwankungen auf, deren Ursachen vermutlich an der Austauschfläche des Katheters zu suchen waren. Der offene Bereich in Form einer Helix erwies sich mechanisch als nicht stabil genug. So kam es zu Verlegung des Katheters durch Hautgewebe oder zu Verschließung des Katheters durch Blutgerinnung. Die Helix selbst ist empfindlich gegen mechanische Verformung bzw. Überdehnung, falls am Katheter versehentlich gezogen oder der Proband beim Bewegen daran hängen blieb. Eine verbesserte Fixierung des Katheters bzw. eine Zugentlastung kann hier Abhilfe schaffen.

System-Probanden-Schnittstelle: Dem tragbaren System fehlte es an einer flexiblen Möglichkeit, um es am Probanden zu fixieren. Dieses Problem wurde weitestgehend behoben, indem die Einzelteile an atmungsaktiver Klebefolie montiert wurden und diese anschließend auf die Haut des Probanden zu kleben. In der Praxis erwies sich das Pumpgehäuse des Prototypen dafür als zu klobig und zu schwer, was nach ein paar Stunden dazu führte, dass es zusätzlich festgeklebt werden musste. Diese Schwäche sollte in einer weiterentwickelten Version leicht behebbar sein. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern und die Fehleranfälligkeit zu verringern, wäre es von Vorteil, dass die unterschiedlichen Einzelteile nur mit einem Schlauchstrang anstatt den drei Einzelschläuchen miteinander verbunden wären. Außerdem sollte bei der Entwicklung eines neuen Pumpgehäuses ein für den Perfusatbeutel geeigneter Platz berücksichtigt werden, damit er nicht ungeschützt zwischen Pumpe, Batterie und Elektronik liegt bzw. dass im Fehlerfall bei Perfusataustritt kein Schaden an den Pumpenkomponenten auftreten kann.

Pumpkreislauf: Da ein reines Push-System, getestet im Vorfeld der Studie, kein stabiles Sampling ermöglichte, wurden an das Proben-Sammel-System abführende Pumpschläuche zur flussratenkontrollierten Evakuierung der Sammelkapillaren montiert. Der so entstandene Pumpkreislauf bestand aus einer flüssigkeitsgefüllten Katheterzufuhr (Push) und einer mit „Luft“ gefüllten Katheterabfuhr (Pull). Das unterschiedliche Pumpverhalten dieser beiden Medien muss in Zukunft noch untersucht werden.

Handling: Die optimale Bedienbarkeit stand nicht im Vordergrund beim Design des Prototypensystems. Jedoch lieferte die Studie Hinweise für Verbesserungen. Wegen der oben genannten Fehlerquellen waren die Inbetriebnahme und das Arbeiten mit dem Prototypensystem nur unter ständiger Beobachtung und mit Erfahrung am System möglich. Beim planmäßigen Probenwechsel entstanden ebenfalls Probleme. Die wurden u.a. verursacht durch versehentliches Abdichten der Katheterenden auf Grund von schlecht eingelegten Glaskapillaren. Ein verbessertes System sollte ein deutlich einfacheres Handling beim Probenwechsel ermöglichen. Davon sollte auch bei einem weiterentwickelten System die Akzeptanz bei den Anwendern abhängen.

4.2 Ergebnisse der klinischen Studie

Ziel dieser Diplomarbeit war nicht die quantitative Beurteilung der Konzentrationen sondern das Anwenden des Systems in der Praxis und Nachweisen des Wirkstoffes in der Zwischenzellflüssigkeit der Haut. Diese Ziele sind in 4.1 diskutiert worden. Hier soll das Augenmerk auf der klinischen Studie und deren pharmakologischen Ergebnissen liegen.

Aufgefallen ist bei den Biopsieresultaten, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der Konzentration in der läsionalen und in der nicht läsionalen Haut gab. Es scheint, dass die schuppige psoriatische Haut wesentlich mehr Creme aufnimmt. Im Vergleich mit dem dermalen Samplingsystem waren die gemessenen Konzentrationen um den Faktor 100 bis 600 größer. So drängt sich die Frage auf, in wie weit die gemessenen Konzentrationen anhand der Biopsie mit denen der OFM vergleichbar sind. Eine einfache Erklärung der hohen Konzentrationen und insbesondere der hohen läsionalen Biopsiekonzentration könnte in der Nicht-Effektivität des Tape-Strippings vor Entnahme der Biopsie liegen. Es ist wahrscheinlich, dass das Tape-Stripping nicht in der Lage war, die Reste des (hoch konzentrierten) Wirkstoffes von der Hautoberfläche zu entfernen. Das Tape-Stripping sollte an den läsionalen Hautstellen noch weniger effektiv gewesen sein, was die überhöhten läsionalen Konzentrationen erklärt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Biopsie-Methode, so wie sie hier eingesetzt wurde, für Pharmakokinetik-Messung von topischen Wirkstoffen wenig geeignet ist.

Die Ermittlung der Setztiefe diente der Veranschaulichung und zur Kontrolle der Lage in der Dermis der Haut. Die korrekte Lage in der Haut konnte in allen Fällen verifiziert werden. Die Genauigkeit dieser Messung stand nicht im Vordergrund. So wurde durch manuelles Auswerten eines Ultraschallbildes die Tiefe festgestellt, wobei die Dicke der schuppigen und läsionalen Haut schwer festzustellen war. Dies hatte mit der Auflösung des Ultraschallgerätes zu tun. 20 MHz waren für eine exakte Vermessung der Dermis zu gering. In Zukunft soll ein Ultraschallgerät mit einer Auflösung von 50 MHz zur Verfügung stehen.

Auffallend waren die höhere Anzahl an Ausreißern, geringere Samplingvolumina und Systemausfälle (z.B. verschlossene Katheter) bei den klinischen Versuchen der letzten drei Probanden (S09, S11, S12). Außerdem wurden auf Grund von Lieferschwierigkeiten die Silikondichtungen von früheren Versuchen desinfiziert und wiederverwendet, was unter Umständen Einfluss auf die Dichtheit im Pull-Zweig und so auch Einfluss auf die Samplingvolumina hatte. Eine Erklärung für Ausreißer (stark überhöhte Kurven, die ausgeschlossen werden mussten) könnten Fehler (eventuell auch Konzentrationsfehler) beim Setzen des Katheters in kontaminierte Haut sein. Es muss in Zukunft daher noch stärker darauf geachtet werden, dass der Katheter beim Setzen in bereits behandelte Haut nicht übermäßig in Kontakt mit der Hautoberfläche kommt. Dies sollte durch Training des Anwenders erreichbar sein.

Um die Wirkstoffkonzentration eines Systems im Labor messen zu können, wurde ein Samplingvolumen von 30 μl benötigt. Falls auch die TNF alpha Konzentration in derselben Stunde zu messen war, wurden mindestens 40 μl benötigt. Mit den drei Kathetern pro System wurde etwas weniger Probenflüssigkeit gesammelt als erwartet. Beim Planen des klinischen Versuches wurde davon ausgegangen, dass mit drei Glaskapillaren (gefüllt je 15 μl) 45 μl pro Stunde gesammelt wird. In der Praxis erwies sich dies als nicht immer erreichbares Ziel. Im besten Fall wurde ca. 14 μl Probenflüssigkeit pro Glaskapillare gesammelt (insgesamt 42 μl). Ursache war, dass beim Herausnehmen des Glasröhrchens aus dem Proben-Sammel-System und beim Ausblasen in den Probenbehälter wegen der Kapillarkraft Probenflüssigkeit an den Dichtungen und in der Kapillare ca. 1-2 μl Probenmenge (Pipetierverluste) verblieb.

Die besonderen Herausforderungen an das Labor bestanden in der großen Anzahl an Proben und im Beschriften, Abwägen und Poolen der Probenflüssigkeit. Jedoch ging keine der 500 Proben wegen analytischer Probleme oder Fehlern im Probenhandling verloren.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Anpassungen und Optimierungen führten zu einem tragbaren dermalen Samplingsystem. Dieses konnte in der klinischen Studie 2.3 dermale Zwischenzellflüssigkeit (ISF) kontinuierlich sammeln und in der ISF konnten die gesuchten Substanzen nachgewiesen werden. Das System wurde sowohl an der Haut des Unter bzw. Oberschenkels als auch an der Haut des Unter bzw. Oberarmes eingesetzt werden. Über die Dauer der gesamten Studie konnte mit dem dermalen Samplingsystem die Pharmakokinetik der Zielsubstanz ermittelt werden. Es konnte auch TNF-alpha in der dermalen Zwischenzellflüssigkeit gemessen werden und daraus konnten Aussagen über die Pharmakodynamik des Wirkstoffes gewonnen werden. Die klinische Studie war hinsichtlich Katheteranzahl, Anwendungsdauer, untersuchte Körperstellen und gewählte Analyten sehr fordernd und lieferte daher viele Hinweise über erforderliche Verbesserungsmaßnahmen am Samplingsystem.

Im Anschluss an die Proof-of-Concept Studie und Diplomarbeit wurden die Komponenten des Prototypensystems weiterentwickelt und verbessert und diese schließlich Ende 2010 als reguläre Medizinprodukte zertifiziert. Mit dem zertifizierten Gesamtsystem wurde eine klinische Studie im Januar 2011 begonnen. Weitere klinische Studien mit dem dermalen Samplingsystem sind schon von HEALTH – JOANNEUM RESEARCH geplant.

Literatur

- [1] Bethan Hughes: 2007 FDA drug approvals: a year of flux. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 107-109 (2008)
- [2] U.S. Food and Drug Administration, Critical Path Initiative: Annual Report 2007 (2007)
- [3] U.S. Food and Drug Administration White Paper: Innovation or Stagnation? Challenge and opportunity on the critical path to new medical products (2004)
- [4] Altenburger Ralf: Transdermale Hormonapplikationssysteme: Untersuchungen zu Transportmechanismus und Hautmetabolismus (Dissertation). Philipps-Universität Marburg; Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, 1998.
- [5] Escobar-Chávez JJ et al.: The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 11(1):104-130 (2008)
- [6] Christophers E, Mrowietz U, Sterry W: Psoriasis - auf einen Blick. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin Wien (2002)
- [7] Koivukangas V: Wound healing in a suction blister model. Doctoral thesis Faculty of Medicine, University of Oulu, Finland (2004)
- [8] Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW: The tape stripping procedure--evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 72(2):317-323 (2009)
- [9] Chaurasia CS et al.: AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. *Pharm Res.* 24(5):1014-1025 (2007)

- [10] Schnetz E, Fartasch M: Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - a promising tool for future research? *Eur J Pharm Sci.* 12(3):165-174 (2001)
- [11] Kreilgaard M: Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Adv Drug Deliv Rev.* 54 Suppl 1:S99-121 (2002)
- [12] Gruendhammer T: Weiterentwicklung der dermalen Offenen Mikroperfusion (OFM) und Quantifizierung kleiner Moleküle in der Haut (Diplomarbeit). TU Graz, Institut für Medizintechnik; JOANNEUM RESEARCH HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften (2004)
- [13] Hoefferer C: Untersuchung des transdermalen Transportes von großmolekularen und lipophilen Substanzen mit der offenen Mikroperfusionstechnik (Diplomarbeit). TU Graz, Institut für Medizintechnik; JOANNEUM RESEARCH HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften (2006)
- [14] Averbeck et al.: In situ profiling and quantification of cytokines released during ultraviolet B-induced inflammation by combining dermal microdialysis and protein microarrays. *Experimental Dermatology* 2006; 15: 447–454 (2006)
- [15] Schaupp L et al.: Direct access to interstitial fluid in adipose tissue in humans by use of open-flow microperfusion. *Am J Physiol.* 276(2 Pt 1):E401-408 (1999)